



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I
Sciences du Vivant

Par

Nicolas LANTZ

**Rôle des récepteurs P2Y₁, P2Y₄ et P2Y₁₂ dans un modèle
d'angiogenèse *in vivo* chez la souris et rôle du récepteur
P2Y₁ dans la fonction de la cellule endothéliale.**

Soutenue publiquement le 14 juin 2007

Membres du jury:

Dr. Christian GACHET
Dr. Martine JANDROT-PERRUS
M. Bernard PAYRASTRE
Pr. Pascal BOUSQUET
Pr. Jean-Pierre CAZENAVE

Directeur de Thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur

Unité de Recherche

INSERM U.311, Etablissement Français du Sang (EFS) – Alsace

Laboratoire de Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase

et de la Thrombose

Directeur : Dr. Christian Gachet

10 rue Spielmann, B.P. 36

67065 Strasbourg Cedex

Tél : +33/ (0)3.88.21.25.25

Fax : +33/ (0)3.88.21.25.21

Direction de thèse:

Dr. Christian Gachet

E-mail: christian.gachet@efs-alsace.fr

Remerciements

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Pierre Cazenave d'être l'examineur de ma thèse et de m'avoir soutenu tout au long de ces années.

Un grand merci au Docteur Christian Gachet de m'avoir accueilli dans le laboratoire et de m'avoir initié à la pharmacologie cardiovasculaire. Pour ton soutien, ta confiance et tes précieux conseils durant ces sept années, je te remercie.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame le Docteur Martine Jandrot-Perrus, Monsieur le Professeur Pascal Bousquet et Monsieur Bernard Payrastre de me faire l'honneur de juger de la qualité de ce travail.

A l'ensemble des membres du laboratoire, et plus particulièrement à Béatrice, je vous remercie de votre aide, de votre disponibilité et de m'avoir soutenu.

A mes parents, je vous remercie pour vos encouragements et votre soutien sans faille tout au long de mes études.

A l'ensemble de ma famille et mes amis, merci d'avoir été à mes côtés.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'appui de mon épouse Véronique. Dans ta générosité, ton soutien sans limite et ton amour, j'ai trouvé la force nécessaire à la réalisation de notre projet. Pour tout le bonheur que tu m'apportes et pour te remercier de ce que tu fais pour moi, je tiens à te dédier cette thèse.

TABLE DES MATIERES

I- INTRODUCTION GENERALE

A. LES RECEPTEURS P2 AUX NUCLEOTIDES EXTRACELLULAIRES.....	11
1. Les récepteurs P2X.....	12
2. Les récepteurs P2Y.....	14
2.1. Les récepteurs P2Y dans les cellules sanguines.....	17
2.2. Les récepteurs P2Y dans les vaisseaux sanguins.....	19
2.3. Les nucléotides extracellulaires dans les fonctions endothéliales.....	22
3. L'ectoenzyme CD39.....	25
3.1. Structure et localisation.....	26
3.2. Fonctions.....	27
B. L'ANGIOGENESE.....	29
1. Les mécanismes de formation des vaisseaux sanguins.....	30
2. Les facteurs antiangiogéniques.....	33
3. Les modèles d'étude <i>in vivo</i> de l'angiogénèse.....	35
C. LA CELLULE ENDOTHELIALE : PRESENTATION ET FONCTIONS.....	40
1. Régulation du tonus et de la perméabilité vasculaires.....	41
1.1. Le NO.....	41
1.2. La prostacycline.....	42
1.3. L'endothéline.....	42
2. Rôle dans l'hémostase et la thrombose.....	43
2.1. Propriétés antithrombotiques.....	43
2.2. Propriétés prothrombotiques.....	44
2.3. Régulation de la fibrinolyse.....	45
3. L'interaction avec les cellules sanguines circulantes.....	46
3.1. Les molécules d'adhésion endothéliales.....	46
3.2. Les interactions avec les plaquettes sanguines.....	50
3.3. Les interactions avec les leucocytes.....	51
4. Méthodes de culture et d'étude.....	54
4.1. L'isolement.....	54
4.2. La culture.....	55
4.3. L'identification.....	56

II- RESULTATS

A. MISE AU POINT DU MODELE D'ANGIOGENESE PAR INJECTION DE MATRIGEL CHEZ LA SOURIS.....	60
1. Introduction.....	60
2. Matériels et méthodes.....	61
3. Résultats.....	64
3.1. Etude cinétique de la cellularité du Matrigel.....	65
3.2. Dosage de l'hémoglobine.....	65
3.3. Identification des cellules.....	68
3.4. Modulation de la réponse angiogénique.....	68

B. ROLE DU RECEPTEUR P2Y₁ DANS LA REPOSE ANGIOGENIQUE	72
C. EFFET DES THIENOPYRIDINES SUR LA REPOSE ANGIOGENIQUE	76
1. Effets du clopidogrel	76
2. Effets de l'énantiomère inactif du clopidogrel	79
D. ROLE DU RECEPTEUR P2Y₄ DANS LA REPOSE ANGIOGENIQUE	82
E. IDENTIFICATION DES RECEPTEURS P2Y PRESENTS DANS LES MACROPHAGES DE SOURIS	88
F. ETUDE DU ROLE DU RECEPTEUR P2Y₁ DANS LES FONCTIONS ENDOTHELIALES	95
1. Développement et caractérisation de cellules endothéliales immortalisées de poumons et de cœurs de souris témoins et KO P2Y ₁	103
2. Rôle du récepteur P2Y ₁ dans la prolifération des cellules endothéliales en culture	110
3. Analyse de l'expression des molécules ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales de souris témoins et KO P2Y ₁	113
G. EFFET DE FORTES CONCENTRATIONS D'ADP SUR LA SECRETION PLAQUETTAIRE	120

III- DISCUSSION GENERALE

122

IV- ANNEXES

<u>Annexe 1:</u> Loss of P2Y ₄ receptor expression leads to <i>in vivo</i> inflammatory disorders	130
---	-----

<u>Annexe 2:</u> A high concentration of ADP induces weak platelet granule secretion independently of aggregation and thromboxane A ₂ production	155
--	-----

V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

162

Index des figures et tableaux	179
-------------------------------------	-----

Liste des abréviations

ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP:	Adénosine 5'-diphosphate
AMP:	Adénosine 5'-monophosphate
AMPc:	Adénosine 5'-monophosphate cyclique
ApoE:	Apolipoprotéine E
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine 5'-triphosphate
BCA:	Bicinchoninic acid
BSA:	Bovine serum albumin
BSS:	Balanced Salt Solution
DAPI:	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMEM:	Dulbecco's modified essential media
E-NTPDase:	Ectonucléoside 5'-triphosphate diphosphohydrolase
ECL:	Enhanced Chemiluminescence
ECGS:	Endothelial cell growth supplements
EDHF:	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA:	Acide éthylènediaminotétraacétique
EGTA:	Acide éthylène glycol-bis (β -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tétraacétique
FGF:	Fibroblast Growth Factor
FvW:	Facteur de von Willebrand
GgP+E:	Gag-Pol et Env
GMPc:	Guanosine 5'-monophosphate cyclique
GP:	Glycoprotéine
HE:	Hématoxyline-éosine
HRP:	Horseradish peroxidase
HSA:	Human serum albumin
HUVEC:	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM:	Intercellular cell adhesion molecule
Ig:	Immunoglobuline
IL:	Interleukine
IP ₃ :	Inositol-1,4,5-triphosphate

ITIM:	Immunoreceptor tyrosine inhibition motifs
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
KO:	Knock-out
LDL:	Low density lipoprotein
LPS:	Lipopolysaccharide
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
MEC:	Matrice extracellulaire
MRS2179:	2'-Déoxy-N ⁶ -méthyl adénosine 3', 5'-diphosphate
NO:	Nitric Oxide
PAR:	Protease activated receptor
PECAM:	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PGI ₂ :	Prostaglandine I ₂
PI3-K:	Phosphoinositide 3-Kinase
PKA:	Protéine Kinase A
PKC:	Protéine Kinase C
PLC:	Phospholipase C
PVDF:	Polyvinylidène difluoride
S1P:	Sphingosine 1-phosphate
SAPK:	Stress-activated protein kinase
SDS:	Sodium dodécylsulfate
t-PA:	Activateur tissulaire du plasminogène
TBS:	Tris buffered saline
TNF:	Tumor necrosis factor
TXA ₂ :	Thromboxane A ₂
u-PA:	Activateur du plasminogène de type urokinase
UDP:	Uridine 5'-diphosphate
UTP:	Uridine 5'-triphosphate
VCAM:	Vascular cell adhesion molecule
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
WP:	Weibel-Palade
WT:	Wild-type

RESUME

En plus de leur rôle dans l'hémostase et la thrombose, les nucléotides extracellulaires interviennent dans différents processus physiologiques et physio-pathologiques tels que la prolifération cellulaire et la modulation de l'apoptose, le contrôle du tonus vasculaire et la réponse inflammatoire, en agissant sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les leucocytes. L'inflammation, la prolifération cellulaire et les plaquettes sanguines tiennent une place importante dans l'angiogenèse ce qui suggère que ces nucléotides pourraient jouer un rôle dans ce processus. Les récepteurs P2Y aux nucléotides sont exprimés sur la plupart des cellules qui participent aux étapes de la formation des vaisseaux sanguins, à savoir les plaquettes sanguines, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les leucocytes, et leur rôle dans l'angiogenèse a été ainsi envisagé.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle des récepteurs P2 des nucléotides dans l'angiogenèse. Pour cela, nous avons d'abord mis au point un modèle d'étude *in vivo* chez la souris. Nous avons aussi été amenés, au cours de ce travail, à établir des lignées immortalisées de cellules endothéliales de souris.

Les principaux résultats de ces travaux sont que, parmi les récepteurs étudiés, le récepteur P2Y₄ semble avoir un rôle important dans l'angiogenèse. Concernant le récepteur P2Y₁, son rôle n'a pas pu être mis en évidence dans le modèle *in vivo*. En revanche, dans les cellules endothéliales immortalisées en culture, il semble participer à la régulation de la prolifération. Enfin, pour étudier le rôle du récepteur P2Y₁₂, nous avons utilisé le clopidogrel, l'inhibiteur sélectif de ce récepteur, ainsi que son énantiomère inactif. Les deux molécules ayant le même impact dans notre modèle *in vivo*, à savoir la formation de zones hémorragiques et une diminution du nombre de vaisseaux formés, nous ne pouvons pas attribuer cet effet à l'inhibition du récepteur P2Y₁₂.

En conclusion, notre travail a permis de mettre à disposition du laboratoire, deux modèles d'étude : un modèle d'angiogenèse *in vivo* et un modèle de culture de cellules endothéliales immortalisées. Concernant les récepteurs P2, seul le récepteur P2Y₄ semble jouer un rôle dans l'angiogenèse.

Des expériences complémentaires permettront d'indiquer l'importance du rôle d'autres récepteurs P2Y, comme les récepteurs P2Y₂ et P2Y₆, ainsi que les récepteurs P2X, dans la formation des vaisseaux sanguins. Leur identification à la surface des cellules endothéliales et des autres cellules participant à l'angiogenèse, permettra non seulement d'étudier leurs fonctions dans la régulation de ces cellules, mais aussi d'envisager leur rôle dans des pathologies dépendantes de l'angiogenèse.

I- INTRODUCTION GENERALE

Les nucléotides adényliques (ADP et ATP) jouent un rôle central dans l'activation des plaquettes sanguines, dans l'hémostase et la thrombose. En plus de leur rôle dans l'hémostase et la thrombose, les nucléotides extracellulaires interviennent dans différents processus physiologiques et physio-pathologiques tels que le contrôle du tonus vasculaire et la réponse inflammatoire, en agissant sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les leucocytes. Les nucléotides extracellulaires participent également à la régulation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire. L'inflammation, la prolifération cellulaire et les plaquettes sanguines tiennent une place importante dans l'angiogenèse ce qui suggère que ces nucléotides pourraient jouer un rôle dans ce processus. Du fait de la présence des récepteurs P2Y aux nucléotides dans les cellules qui participent aux étapes de la formation des vaisseaux sanguins, un rôle de ces récepteurs dans l'angiogenèse a été envisagé.

L'introduction de ce mémoire présentera, de façon générale, les récepteurs P2 aux nucléotides extracellulaires, leur classification, leur fonctionnement ainsi que leur localisation et leur rôle connus dans le système vasculaire. La cellule endothéliale joue un rôle central dans la régulation du système vasculaire et dans l'angiogenèse, et des fonctions endothéliales sont régulées par les nucléotides extracellulaires. Un chapitre détaillera celles qui ont été les plus documentées, puis un chapitre abordera l'enzyme qui permet de contrôler l'action des nucléotides extracellulaires. Ensuite, les étapes et les mécanismes régulant l'angiogenèse seront abordés de façon générale et les modèles d'étude de l'angiogenèse les plus utilisés seront décrits. Enfin, les principales fonctions de la cellule endothéliale seront détaillées et les méthodes de culture et d'étude de ces cellules seront présentées.

A. Les récepteurs P2 aux nucléotides extracellulaires

Les nucléotides extracellulaires sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. Il existe trois voies majeures par lesquelles les nucléotides peuvent s'accumuler dans le milieu extracellulaire : la nécrose et le transport transmembranaire qui libèrent les nucléotides contenus dans le cytosol des cellules, et l'exocytose qui permet la sécrétion de nucléotides présents dans des vésicules ou des granules (Lazarowski, Boucher et al. 2003; Boeynaems, Communi et al. 2005). Dès lors dans le compartiment extracellulaire, ils exercent de nombreuses fonctions physiologiques *via* leur action sur des récepteurs purinergiques présents à la surface cellulaire, les récepteurs P2, dont de nombreux sous-types ont été clonés. Les premiers effets des nucléotides avaient été rapportés par Drury et Szent-Györgyi en 1929, qui observaient que l'injection intraveineuse d'ATP diminuait la fréquence cardiaque chez le cobaye (Drury and Szent-Györgyi 1929). Burnstock proposa, en 1972, l'existence de transmissions neuronales à l'ATP, distinctes des transmissions adrénérgiques ou cholinérgiques au niveau du système nerveux autonome, qu'il nomma transmission purinergique (Burnstock 1972).

Depuis, diverses réponses aux nucléotides ont été identifiées et documentées dans une grande variété de systèmes et d'espèces biologiques ; ces réponses incluent la neurotransmission, le contrôle de la tonicité vasculaire, la réponse immunitaire, l'inflammation, la médiation de la douleur, la modulation de la fonction cardiaque et l'hémostase (Ralevic and Burnstock 1998). Les nucléotides exercent l'ensemble de ces effets par l'intermédiaire de récepteurs membranaires regroupés sous le nom de récepteurs P2 par opposition aux récepteurs P1 qui sont activés par l'adénosine (Burnstock 1978). Ces récepteurs P2 sont actuellement classés en deux grandes familles sur la base de leur structure primaire et de leur mécanisme de transduction des signaux. On distingue d'une part, la famille des récepteurs P2X qui sont des récepteurs canaux et d'autre part, la famille des récepteurs P2Y, caractérisés par leurs sept domaines transmembranaires et leur couplage à des protéines G hétérotrimériques (Abbracchio and Burnstock 1994). Les deux familles de ces récepteurs sont commentées ci-dessous.

1. Les récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont des récepteurs canaux à l'ATP de type cationiques mixtes, c'est-à-dire perméants à la fois au calcium, au sodium et au potassium (Vial and Evans 2002). Leur activation se traduit par l'ouverture du canal ionique, suivi d'un courant entrant très rapide (en 10 ms) de calcium et de sodium, et d'une désensibilisation (Bean 1992). Sept sous-types de récepteurs P2X sont identifiés et clonés (P2X₁₋₇) (Ralevic and Burnstock 1998). Leur structure commune comprend deux segments transmembranaires, une grande boucle extracellulaire (environ 260 acides aminés) avec une dizaine de résidus cystéines pouvant former des ponts disulfures, et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires (North and Barnard 1997) (**figure 1**). Pour fonctionner, ces récepteurs s'associent sous la forme d'homo- ou même d'hétéro-multimères dans le cas des sous-types P2X₂₋₃ et P2X₁₋₅ (Haines, Torres et al. 1999). Les récepteurs P2X sont très largement distribués, particulièrement sur les cellules excitables. Des réponses leurs étant attribuées ont été détectées dans les neurones, les cellules gliales, les cellules épithéliales, l'os, le muscle, les tissus hématopoïétiques et les plaquettes sanguines (North and Barnard 1997). Le récepteur P2X₁ est exprimé dans les plaquettes et son rôle dans la formation des thrombi a été illustré dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Hechler, Zhang et al. 2003). Dans les cellules musculaires lisses d'artères mésentériques de souris, le récepteur P2X₁ est exprimé et il est responsable d'une vasoconstriction en réponse à l'ATP (Vial and Evans 2002). Au niveau endothélial, les récepteurs P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ et P2X₇ ont été décrits (Hansen, Dutton et al. 1999; Loesch and Burnstock 2000; Yamamoto, Korenaga et al. 2000; Glass and Burnstock 2001; Ramirez and Kunze 2002; Ray, Huang et al. 2002). Cependant, comme les récepteurs P2Y, la distribution de ces récepteurs varie selon le territoire vasculaire. Par exemple, des études immunohistochimiques concernant le récepteur P2X₄ ont démontré que son expression est très importante au niveau de veines saphènes alors qu'elle est faible au niveau d'artères mammaires humaines (Ray, Huang et al. 2002). Certaines données suggèrent que l'ouverture des récepteurs canaux P2X pourrait activer la cascade des MAPK. C'est le cas du récepteur P2X₂ dans les cellules PC12 de rat, (Swanson, Reigh et al. 1998) et du récepteur P2X₁ dans les plaquettes (Oury, Toth-Zsomboki et al. 2002). Néanmoins le mode d'action premier des récepteurs P2X est lié à l'entrée de calcium dans la cellule, et surtout à la dépolarisation de la membrane dans les cellules excitables, qui peut propager un potentiel d'action ou entraîner la contraction de cellules musculaires lisses par exemple.

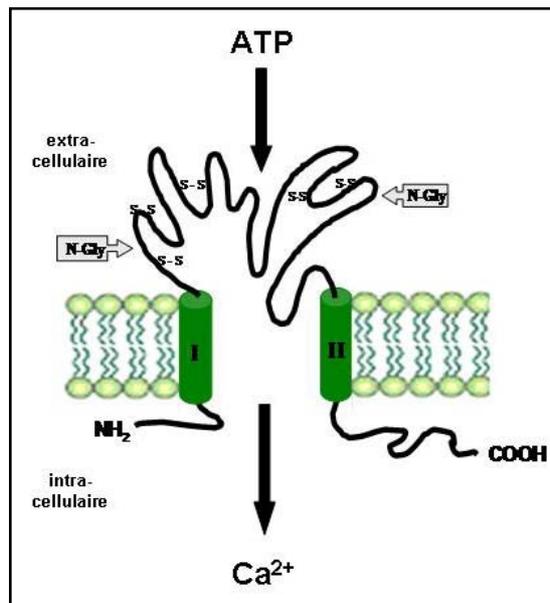


Figure 1: Structure secondaire des récepteurs P2X.

Structure schématique de la topologie des récepteurs canaux P2X comprenant deux domaines transmembranaires (I et II), une grande boucle extracellulaire contenant plusieurs ponts disulfures (S-S) et des sites de N-glycosylations (N-Gly). L'activation des récepteurs P2X par l'ATP est responsable d'un influx rapide de calcium extracellulaire vers le cytosol.

2. Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G hétérotrimériques (**figures 2-3**). Contrairement aux récepteurs canaux P2X, les récepteurs P2Y se différencient par leur sensibilité aux différents nucléotides : ATP, ADP, UTP, UDP et UDP-Glucose. Les récepteurs P2Y₁ et P2Y₂ furent les deux premiers de cette famille à être clonés (Lustig, Shiau et al. 1993; Webb, Simon et al. 1993). Depuis, cette famille s'est agrandie et compte désormais huit sous-types identifiés : P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ (Ralevic and Burnstock 1998; Kennedy 2000; von Kugelgen and Wetter 2000; Abbracchio, Burnstock et al. 2006). Leur pharmacologie diffère légèrement entre l'Homme et les rongeurs mais leurs principaux agonistes sont : l'ADP (P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃), ATP/UTP (P2Y₂, P2Y₁₁), UTP (P2Y₄ humain) ou ATP/UTP (P2Y₄ rongeurs), UDP (P2Y₆) et l'UDP-glucose (P2Y₁₄) (von Kugelgen and Wetter 2000; Abbracchio, Boeynaems et al. 2003; von Kugelgen 2006). Ces récepteurs peuvent être classés en deux groupes selon leur couplage aux protéines G hétérotrimériques. Un groupe de récepteurs, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ et P2Y₆, est couplé à une protéine G α_q qui permet l'activation de la PLC β et la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires (von Kugelgen 2006) (**figure 2**). Le deuxième groupe est composé des récepteurs P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄ qui sont couplés à une protéine G α_i responsable de l'inhibition de l'adénylate cyclase et de la diminution des concentrations intracellulaires d'AMPC (von Kugelgen 2006) (**figure 3**). Le récepteur P2Y₁₁ possède l'originalité d'interagir en même temps avec des protéines G α_q et G α_s quand il est stimulé par l'ATP et d'interagir avec une protéine G α_o lors de son activation par l'UTP (Communi, Robaye et al. 1999; White, Webb et al. 2003).

Après leur stimulation, les récepteurs P2Y se désensibilisent rapidement suite à leur stimulation et ils sont réfractaires à une deuxième stimulation. Leur étude pharmacologique est rendue délicate par le faible nombre d'agonistes et d'antagonistes sélectifs disponibles pour ces récepteurs. Des confusions peuvent ainsi exister lors de l'interprétation de résultats et quant à l'implication des différents sous-types de récepteurs P2Y dans des mécanismes ou fonctions cellulaires.

Les récepteurs P2Y sont exprimés de façon ubiquitaire dans les tissus et de nombreux sous-types ont été identifiés au niveau vasculaire et plus particulièrement, à la surface des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des plaquettes sanguines où ils participent à la régulation du système vasculaire et où ils pourraient être impliqués dans de

nombreuses pathologies cardiovasculaires (Boarder and Hourani 1998; Burnstock 2002; Di Virgilio and Solini 2002; Van Der Giet, Giebing et al. 2002; Gachet 2006).

Le **tableau en page 16** est un récapitulatif des différents sous-types des récepteurs P2Y qui ont été actuellement identifiés, ainsi que leur pharmacologie, leur signalisation intracellulaire et leurs distributions tissulaire et cellulaire.

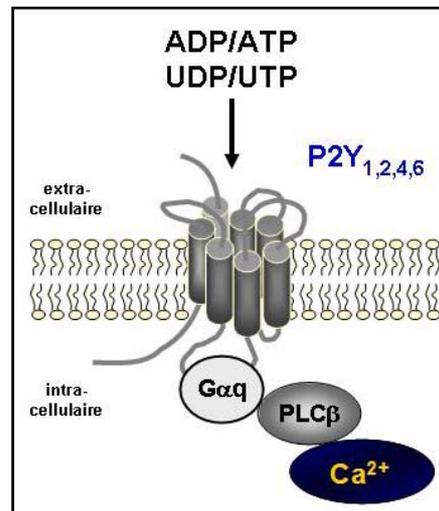


Figure 2: Structure des récepteurs P2Y couplés à une protéine $G\alpha_q$.

Structure schématique de la topologie des récepteurs P2Y à sept domaines transmembranaires et couplés à une protéine $G\alpha_q$. La stimulation de ces récepteurs par un agoniste est responsable d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Ces récepteurs sont P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ et P2Y₆.

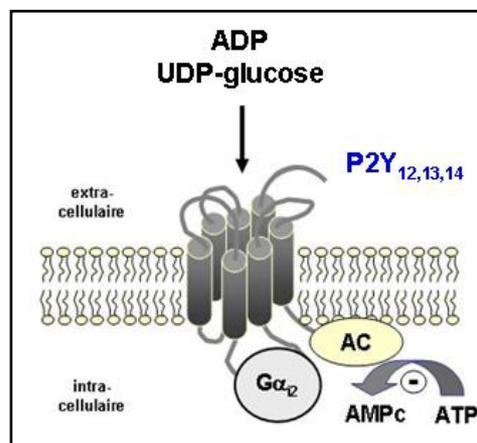


Figure 3: Structure des récepteurs P2Y couplés à une protéine $G\alpha_i$.

Structure schématique de la topologie des récepteurs P2Y à sept domaines transmembranaires et couplés à une protéine $G\alpha_i$. La stimulation de ces récepteurs par un agoniste est responsable d'une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase, suivie d'une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc. Ces récepteurs sont P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄.

RECEPTEUR	ESPECE	AGONISTES ORDRE DE SELECTIVITE	COUPLAGE PROTEINE G	EFFECTEURS	ANTAGONISTES ORDRE DE SELECTIVITE	DISTRIBUTION TISSULAIRE	DISTRIBUTION CELLULAIRE
P2Y ₁	h,r,s	(N)-methanocarpa-2-MeSADP> 2-MeSADP>>ADP =ADP α S>ADP β S	Gq	PLC β / IP ₃ / Ca ²⁺	MRS2500>MRS2279, MRS2179> A3P5PS, A3P5P, A2P5P>PPADS, suramine, Reactive blue 2	cœur, muscle squeletique, pancréas, rate, cerveau, prostate, tissu neuronal, placenta, épithelium voies aériennes	plaquettes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, mastocytes, macrophages, monocytes, fibroblastes, lymphocytes, polynucléaires, cellules dendritiques
P2Y ₂	h,r,s	ATP=UTP>Up ₄ U=Ap ₄ A>dCp ₄ U>Ip ₄ U>ATP γ S	Gq	PLC β / IP ₃ / Ca ²⁺	suramine	cœur, muscle squeletique, poumon, rate, rein, foie, épithéliums, moelle osseuse, épithelium voies aériennes, oreille interne	cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, mastocytes, lymphocytes, monocytes, macrophages, fibroblastes, polynucléaires, cellules dendritiques
P2Y ₄	h r,s	UTP>Ip ₄ U>Up ₄ U=Ap ₄ A>dCp ₄ U>UTP γ S>>ATP UTP=ATP=ITP=Ap ₄ A	Gq	PLC β / IP ₃ / Ca ²⁺	PPADS>>Reactive blue 2 Reactive blue 2	placenta, poumon, intestin, cerveau, oreille interne	cellules musculaires lisses cellules dendritiques, fibroblastes cellules endothéliales
P2Y ₆	h,r,s	UDP>INS415	Gq	PLC β / IP ₃ / Ca ²⁺	MRS2578>MRS2567>> Reactive blue 2>PPADS>suramine	cœur, poumon, aorte, rate, placenta, rein, thymus, cerveau, intestin, os, épithelium voies aériennes	cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, macrophages, monocytes, fibroblastes, lymphocytes, polynucléaires, cellules dendritiques
P2Y ₁₁	h	ATP>2-MeSATP UTP	Gq et Gs Go	PLC β / IP ₃ / Ca ²⁺ et \uparrow AC Ca ²⁺	suramine>PPADS	rate, intestin, cerveau, rein	cellules musculaires lisses, mastocytes, lymphocytes, macrophages, monocytes, polynucléaires, cellules dendritiques cellules endothéliales
P2Y ₁₂	h,r,s	2-MeSADP>>ADP=ADP β S	Gi	\downarrow AC	Clopidogrel, Ticlopidine, CS-747, AR-C69931MX, AR-C66096MX, AR-C67085MX, C1330-7, 2-MeSATP, ADP α S, 2-MeSAMP	cerveau	plaquettes, cellules endothéliales de capillaires de cerveau
P2Y ₁₃	h,s	2-MeSADP>ADP>ADP β S	Gi	\downarrow AC	MRS2211=AR-C69931MX>2-MeSAMP= Reactive blue 2=suramine>PPADS	cerveau, rate, foie, pancréas	mastocytes, monocytes, lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques
P2Y ₁₄	h	UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-acide glucuronique, UDP-N-acétylglycosamine	Gi	\downarrow AC	?	cœur, placenta, tissu adipeux, estomac, intestin, cerveau, rate, poumon	cellules dendritiques

h=Humain ; r=Rat ; s=Souris ; AC=adénylate cyclase ; PLC=phospholipase C ; IP₃=inositol-1,4,5-triphosphate.

D'après et adapté de (von Kugelgen and Wetter 2000; von Kugelgen 2006).

Récapitulatif de la pharmacologie des différents récepteurs P2Y identifiés et leurs distributions tissulaire et cellulaire.

2.1. Les récepteurs P2Y dans les cellules sanguines

L'identification et le fonctionnement des récepteurs P2Y ont été particulièrement étudiés dans l'hémostase et la thrombose, et notre laboratoire a apporté une contribution importante dans ces études. A ce niveau, les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ ont été identifiés à la surface des plaquettes sanguines et leur structure ainsi que leur rôle sont à présent exposés.

Les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ des plaquettes sanguines

Le récepteur P2Y₁ est nécessaire à l'activation normale des plaquettes par l'ADP (Hechler, Eckly et al. 1998; Jin, Dasari et al. 1998; Savi, Beauverger et al. 1998) car il est responsable du changement de forme et de l'agrégation transitoire des plaquettes en réponse à l'ADP (Hechler, Eckly et al. 1998; Savi, Beauverger et al. 1998; Gachet 2001). Il a aussi été démontré que ce récepteur permet l'exposition de P-sélectine à la surface des plaquettes pour permettre la formation d'agrégats leucoplaquettaires (Léon, Ravanat et al. 2003). La structure et la fonction de la molécule adhésive P-sélectine seront évoquées en page 46.

De son côté, le récepteur P2Y₁₂ plaquettaire est important pour l'activation complète des plaquettes par l'ADP et il a également un rôle important dans l'amplification de l'agrégation plaquettaire induite par d'autres agonistes comme le TxA₂ et la thrombine (Gachet 2001). Il est aussi impliqué dans l'activité procoagulante des plaquettes (Herault, Dol et al. 1999; Léon, Ravanat et al. 2003; Léon, Alex et al. 2004).

La caractérisation pharmacologique de ces deux récepteurs a été réalisée essentiellement dans les plaquettes sanguines. Ils sont activés par l'ADP, et l'ATP et ses analogues triphosphates sont des antagonistes compétitifs (Leon, Hechler et al. 1997; Hechler, Eckly et al. 1998; Park and Hourani 1999; Kauffenstein, Hechler et al. 2004). Pour le récepteur P2Y₁, la disponibilité de plusieurs antagonistes sélectifs a permis d'étudier son rôle dans les fonctions plaquettaires. Ces antagonistes sont l'A2P5P, l'A3P5P, l'A3P5PS (Abbracchio, Boeynaems et al. 2003), le MRS2179 (Léon, Freund et al. 2001; Abbracchio, Boeynaems et al. 2003; Baurand and Gachet 2003), le MRS2279 (Abbracchio, Boeynaems et al. 2003) et enfin le MRS2500 (Cattaneo, Lecchi et al. 2004; Hechler, Nonne et al. 2006). Le récepteur P2Y₁₂ possède un antagoniste compétitif, l'AR-C69931MX (Gachet 2006), et surtout, il est la cible des thiényridines antiagrégantes plaquettaires (ticlopidine, Ticlid[®] et clopidogrel, Plavix[®]) qui sont des antagonistes irréversibles de ce récepteur (Savi and Herbert 2005).

Le récepteur P2Y₁ est le premier récepteur P2 à avoir été cloné en 1993, à partir d'une banque d'ADNc de cerveau d'embryon de poulet (Webb, Simon et al. 1993). Sa présence dans les plaquettes sanguines, initialement suggérée par la détection d'ARNm dans les mégacaryocytes et les plaquettes, a été confirmée par des études pharmacologiques à l'aide d'antagonistes sélectifs (Leon, Hechler et al. 1997; Hechler, Eckly et al. 1998). Le récepteur P2Y₁ humain est constitué de 373 acides aminés et il possède une structure à sept domaines transmembranaires caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G. Il est exprimé de façon ubiquitaire dans de très nombreux types cellulaires différents dont les cellules endothéliales (Burnstock 2002; Di Virgilio and Solini 2002; Gachet 2006) et son expression tissulaire a été identifiée dans le cœur, les vaisseaux sanguins, les testicules, les muscles lisses, la prostate, les ovaires et les tissus nerveux (Léon, Vial et al. 1996; Piroton, Communi et al. 1996; Ralevic and Burnstock 1998).

Le récepteur P2Y₁₂ a été cloné à partir de banques d'ADNc de plaquettes humaines et de rat. Le récepteur P2Y₁₂ humain présente une structure à sept domaines transmembranaires caractéristique des récepteurs couplés à une protéine G, et il se compose de 342 acides aminés. Son expression est restreinte aux plaquettes et aux cellules gliales de certaines régions cérébrales (Hollopeter, Jantzen et al. 2001). Cette distribution très restreinte fait de ce récepteur une cible de choix pour des molécules antithrombotiques. Une étude récente a suggéré la présence de ce récepteur dans des cellules musculaires lisses vasculaires, où il régulerait la vasoconstriction (Wihlborg, Wang et al. 2004).

Des souris déficientes pour l'expression de ces deux récepteurs ont été générées. Les souris KO P2Y₁ ont été obtenues dans notre laboratoire et les plaquettes sanguines issues de ces souris présentent une absence d'agrégation à l'ADP (Léon, Hechler et al. 1999). Ces souris sont également résistantes à certains types de thromboses expérimentales (Léon, Freund et al. 2001). Les souris KO P2Y₁₂ possèdent des plaquettes qui présentent un défaut d'agrégation à l'ADP (Foster, Prosser et al. 2001). Ces souris ne sont pas sensibles à un traitement au clopidogrel, ce qui montre que cette molécule agit bien sur ce récepteur (Foster, Prosser et al. 2001; Andre, Delaney et al. 2003).

L'ensemble de ces données illustre le rôle clé de ces deux récepteurs dans l'activation plaquettaire et la thrombose.

Les récepteurs P2Y des leucocytes

Les leucocytes expriment des récepteurs P2X et des récepteurs P2Y. Concernant les récepteurs P2Y, l'expression des récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁ et P2Y₁₃ a été démontré dans des monocytes/macrophages, des lymphocytes et des polynucléaires (Di Virgilio and Solini 2002; Wihlborg, Wang et al. 2004; von Kugelgen 2006). A ce niveau, peu de fonctions ont été attribuées à ces récepteurs, mais des effets de l'ADP et de l'ATP sur l'exposition de l'intégrine Mac-1, la production d'anion superoxyde, la sécrétion de TNF α et d'IL-1 β , et la sécrétion du contenu des granules des polynucléaires ont été décrits (Di Virgilio and Solini 2002). Le récepteur P2Y₆ est le seul à avoir été clairement identifié dans la production d'IL-8 dans des monocytes humains, en réponse à l'UDP ou au LPS (Warny, Aboudola et al. 2001). En résumé, ces récepteurs semblent être impliqués dans la production de médiateurs de l'inflammation dans les leucocytes, mais d'autres études seront nécessaires afin de comprendre leur fonction dans ces cellules.

2.2. Les récepteurs P2Y dans les vaisseaux sanguins

En plus de leur rôle dans l'hémostase, la thrombose et la production de facteurs inflammatoires, les nucléotides extracellulaires interviennent dans d'autres processus physiologiques comme le contrôle du tonus vasculaire, en agissant sur les récepteurs P2 présents à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.

Les récepteurs P2Y des cellules musculaires lisses

Plusieurs études ont suggéré que l'ATP et l'UTP induisent l'activation (Communi, Janssens et al. 2000), la stimulation du cycle cellulaire (Malam-Souley, Seye et al. 1996) et la prolifération des cellules musculaires lisses (Wang, Huang et al. 1992; Erlinge 1998), mais les récepteurs P2Y impliqués dans ces fonctions n'ont pas été identifiés. Des expériences de RT-PCR et l'utilisation de suramine, un antagoniste non sélectif de récepteurs P2Y, ont démontré que les récepteurs P2Y₂ et P2Y₆ sont impliqués dans la migration de cellules musculaires lisses, en réponse à l'UTP et l'UDP (Pillois, Chaulet et al. 2002). D'autres récepteurs P2Y ont été identifiés dans ces cellules par des expériences de RT-PCR : P2Y₁, P2Y₄ et P2Y₁₁ (Kunapuli and Daniel 1998; Wang, Karlsson et al. 2002). Concernant le récepteur P2Y₁, la quantité d'ARNm codant pour ce récepteur est faible comparée à celle codant pour les

récepteurs P2Y₂, P2Y₄ et P2Y₆ ce qui suggère une expression réduite de ce récepteur dans les cellules musculaires lisses (Wang, Karlsson et al. 2002).

Les récepteurs P2Y des cellules endothéliales

Après la découverte que des nucléotides adényliques (2-MeSATP et ADP) stimulaient la production de PGI₂ par des cellules endothéliales porcines en culture (Pearson, Slakey et al. 1983; Needham, Cusack et al. 1987), il a été établi que ces réponses résultaient de l'activation de récepteurs P2Y couplés à une phospholipase C.

L'ATP induit une vasodilatation et une diminution de la pression artérielle *via* la sécrétion de substances vasoactives comme le facteur EDHF et la PGI₂ (Carter, Hallam et al. 1988; Boeynaems and Pearson 1990) et différentes études pharmacologiques ont été menées sur des cellules endothéliales d'aorte bovine en culture et elles ont révélé que ces effets étaient médiés plus particulièrement par le récepteur P2Y₂ (Motte, Piroton et al. 1993; Wilkinson, Purkiss et al. 1993). Il a été vérifié que ces effets n'étaient pas la conséquence de la mise en culture des cellules endothéliales puisque des résultats similaires ont été observés sur des préparations d'anneaux d'aorte bovine (Wilkinson, McKechnie et al. 1994). D'autres études ont démontré que la production de NO, PGI₂ et de EDHF, en réponse à l'ADP, était médié par le récepteur P2Y₁ dans des cellules endothéliales d'origines différentes : d'artère mammaire humaine (Wihlborg, Malmsjo et al. 2003), d'aorte bovine (Purkiss, Wilkinson et al. 1994), d'artère mésentérique et d'aorte de rat (Ralevic and Burnstock 1996; Hansmann, Bultmann et al. 1997) et d'aorte de cobaye (Kaiser and Buxton 2002). Une autre fonction du récepteur P2Y₁ dans la cellule endothéliale est celle de la régulation de la taille et de la perméabilité de ces cellules (Tanaka, Kawasaki et al. 2003; Tanaka, Kawasaki et al. 2004). La présence et l'implication des récepteurs P2Y₁ et P2Y₂ dans ces réponses endothéliales ont été mises en évidence essentiellement à l'aide d'agonistes (ADP, ADPβS, ATP et UTP) et d'antagonistes plus ou moins sélectifs de ces récepteurs (MRS2179, A3P5P, PPADS, suramine, reactive blue 2) et dans des expériences de RT-PCR (Jin, Dasari et al. 1998; Wang, Karlsson et al. 2002), de mesures de mouvements calciques intracellulaires (Crawford, MacCallum et al. 1993; Castro, Tome et al. 1994; Duchene and Takeda 1997; Zhang, Weir et al. 1997; Zunkler, Grafe et al. 1999; Cha, Hahn et al. 2000; Moccia, Baruffi et al. 2001) et de dosages d'inositol triphosphate (Wilkinson, Purkiss et al. 1993; Purkiss, Wilkinson et al. 1994; Communi, Raspe et al. 1995; Piroton, Communi et al. 1996).

L'expression du récepteur P2Y₄ dans les cellules endothéliales est controversée dans la mesure où il a été démontré présent dans des HUVEC par des expériences de RT-PCR (Jin,

Dasari et al. 1998; Wang, Karlsson et al. 2002), mais il n'a pas été mis en évidence dans des artères mésentériques de souris (Vial and Evans 2002), suggérant une expression différentielle selon le territoire vasculaire étudié. Le récepteur P2Y₄ est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G α_q (**figure 2**) et il est composé de 365 acides aminés. L'originalité de ce récepteur réside dans le fait que, chez l'Homme, l'UTP est agoniste (Communi, Raspe et al. 1995; Nguyen, Erb et al. 1995; Nicholas, Watt et al. 1996; Stam, Klomp et al. 1996) alors que chez les rongeurs, il est activé de façon équivalente par l'ATP et l'UTP, tout comme le récepteur P2Y₂ (Webb, Simon et al. 1993; Bogdanov, Wildman et al. 1998; Lazarowski, Rochelle et al. 2001). L'essentiel de l'étude pharmacologique de ce récepteur a été réalisée sur des cellules d'astrocytome humain (1321NI) et elle est rendue délicate du fait de l'absence d'antagoniste sélectif et de sa pharmacologie similaire avec celle du récepteur P2Y₂ (**tableau page 16**). Le récepteur P2Y₄ humain a été identifié dans le placenta (Communi, Pirotton et al. 1995) tandis que le récepteur de souris est exprimé dans l'intestin, l'estomac et le foie (Suarez-Huerta, Pouillon et al. 2001). Au niveau cellulaire, en plus de son expression dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, il est également exprimé dans des cellules mucosales de poumon humain (Communi, Paindavoine et al. 1999) et dans des cellules épithéliales d'oreille interne de gerbille (Marcus and Scofield 2001). Des souris déficientes pour l'expression de ce récepteur ont été générées et elles ne présentent pas de phénotype particulier, excepté au niveau de l'épithélium de jéjunum où l'absence de ce récepteur perturbe la sécrétion d'ion chlore (Cl⁻) induite par l'ATP ou l'UTP (Robaye, Ghanem et al. 2003).

Le récepteur P2Y₆ a été mis en évidence à la surface de HUVEC par des expériences de RT-PCR (Jin, Dasari et al. 1998; Wang, Karlsson et al. 2002), mais une absence de réponse calcique suite à une stimulation par de l'UDP a suggéré son absence dans des cellules endothéliales d'aorte de cobaye (Kaiser and Buxton 2002). Son implication dans la vasodilatation induite par l'UDP a été démontrée dans des artères mammaires humaines (Wihlborg, Malmsjo et al. 2003) ainsi que dans l'aorte de souris (Guns, Korda et al. 2005).

Une étude a permis de mettre en évidence la présence du récepteur P2Y₁₁ dans des HUVEC par des expériences de RT-PCR (Wang, Karlsson et al. 2002), mais aucune fonction ne lui a été associée pour l'instant.

Un autre exemple d'expression différentielle selon le territoire vasculaire est celui du récepteur P2Y₁₂. En effet, alors que celui-ci a été clairement démontré comme étant le récepteur responsable de l'amplification de l'agrégation des plaquettes sanguines en réponse à l'ADP (Hechler, Eckly et al. 1998; Gachet 2006), il a également été mis en évidence sur une

lignée cellulaire endothéliale B10, provenant de capillaires de cerveau de rat (Simon, Vigne et al. 2001). A ce niveau, il apparaît réguler des canaux K^+ et Na^+ voltages-dépendants (Simon, Filippov et al. 2002) mais aucun lien avec une quelconque fonction n'a encore été établi.

En résumé, il apparaît que l'expression des récepteurs P2Y au niveau endothélial varie en fonction du territoire vasculaire ; de plus, au niveau d'une même cellule endothéliale, plusieurs récepteurs P2Y différents coexistent. La grande diversité d'expression de ces récepteurs au niveau endothélial reflète la complexité avec laquelle les fonctions de la cellule endothéliale sont régulées.

2.3. *Les nucléotides extracellulaires dans les fonctions endothéliales*

Rôle des nucléotides extracellulaires dans la prolifération

La prolifération de la cellule endothéliale est extrêmement régulée dans un vaisseau sanguin sain où les cellules endothéliales sont dans un état de quiescence. Dans un contexte de lésion vasculaire ou d'hypoxie suite à l'occlusion d'une artère ou à la croissance tumorale par exemple, les cellules endothéliales s'activent et prolifèrent afin d'initier la réparation du vaisseau lésé ou la formation d'un nouveau réseau vasculaire.

Il a été démontré que des nucléotides, l'ADP, l'ATP et l'UTP sont des facteurs qui induisent la migration et la prolifération de cellules endothéliales en culture (McAuslan, Reilly et al. 1983; Satterwhite, Farrelly et al. 1999; Kaczmarek, Erb et al. 2005), deux processus clés dans l'angiogenèse. Après la démonstration que l'ADP, l'adénosine et l'adénine étaient de puissants facteurs chimiotactiques, il a été postulé que les nucléotides extracellulaires devaient participer à des mécanismes régulant l'angiogenèse *in vivo* (Teuscher and Weidlich 1985). Par la suite, d'autres études ont confirmé l'implication de l'ATP, l'UTP et l'ADP mais également des analogues non-hydrolysables comme, l'ATP γ S et l'ADP β S, dans la prolifération de cellules endothéliales en culture et d'origines diverses : de capillaires de cerveau humain (Rathbone, Middlemiss et al. 1992), de HUVEC (Gendaszewska-Darmach, Maszewska et al. 2003), de cœur de cobaye (Satterwhite, Farrelly et al. 1999) et d'aorte et de cornée bovines (Van Daele, Van Coevorden et al. 1992; Cha, Hahn et al. 2000). L'étude menée par Cha, Hahn et collaborateurs a mis en évidence l'implication des récepteurs P2Y dans la prolifération de cellules endothéliales bovines en culture, induite par l'ATP ; en effet, l'utilisation de suramine, un antagoniste non-sélectif des récepteurs P2Y et l'utilisation

du composé U73122, un inhibiteur de phospholipase C, inhibent la prolifération de ces cellules induite par l'ATP.

L'effet mitogénique des nucléotides extracellulaires sur les cellules endothéliales peut s'expliquer par deux hypothèses : la première hypothèse est leur capacité à activer des protéines kinases de type p42/p44 MAPK et PKC- ϵ (Graham, McLees et al. 1996; Patel, Brown et al. 1996), impliquées dans la signalisation menant à la prolifération cellulaire (Luttrell 2003). La deuxième hypothèse concerne leur capacité à inhiber l'effet proapoptotique de facteurs inflammatoires tels que le TNF α . Ceci est renforcé par une étude menée sur une lignée de cellules endothéliales humaines dans laquelle, l'ATP et l'UTP inhibent l'activation d'une autre voie de MAPK (SAPK : p38 MAPK et JNK) (Paul, Torrie et al. 2000) impliquée dans l'inflammation et l'apoptose cellulaire, après stimulation au TNF α (Luttrell 2003).

Il est intéressant de noter que des nucléotides sont sécrétés dans le milieu par des cellules endothéliales en culture, de façon constitutive et en réponse à de faibles événements tels que les changements de milieu de culture ou à l'agitation de la boîte de culture (Lazarowski, Boucher et al. 2003). Ceci permet aux nucléotides ainsi relargués, d'exercer leur rôle mitogénique ou antiapoptotique mais également de contrôler d'autres processus tels que la régulation de la taille (Tanaka, Kawasaki et al. 2003) et de la perméabilité (Tanaka, Kawasaki et al. 2004) des cellules endothéliales *via* les récepteurs P2Y.

Rôle des nucléotides extracellulaires dans la sécrétion et l'exposition de molécules adhésives

Les granules contenus dans le cytosol de la cellule endothéliale, appelés les corps de Weibel-Palade (WP), sont riches en facteur de von Willebrand (fvW) et ils renferment également des molécules de P-sélectine (Furie, Furie et al. 2001). Ces deux molécules jouent un rôle capital dans l'adhésion des plaquettes sanguines au niveau d'une brèche vasculaire pour permettre l'hémostase (fvW), et dans le recrutement de leucocytes lors d'une inflammation (P-sélectine).

Dans des cellules endothéliales en culture, il a été démontré que plusieurs agonistes induisent la sécrétion du contenu des corps de WP : la thrombine (Birch, Pober et al. 1992), l'histamine (Hamilton and Sims 1987), la fibrine (Ribes, Francis et al. 1987), des leucotriènes (Datta, Romano et al. 1995) et des radicaux libres (Vischer, Jornot et al. 1995). Il a également été mis en évidence que l'ATP et l'ADP induisent une sécrétion de fvW (Palmer, Aye et al. 1994; Vischer and Wollheim 1998; Goepfert, Imai et al. 2000) et que toutes ces réponses sont

dépendantes d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Birch, Ewenstein et al. 1994) et de la voie calmoduline (Birch, Pober et al. 1992), suggérant l'implication de récepteurs P2Y. Cependant, aucune étude n'a permis d'identifier précisément quel(s) sous-type(s) de récepteurs P2Y participe à cette sécrétion.

Les nucléotides peuvent également induire l'exposition d'autres molécules adhésives endothéliales qui permettent la liaison de leucocytes. Par exemple, l'ATP et l'UTP induisent la synthèse et l'exposition de la molécule d'adhésion VCAM-1 à la surface de cellules endothéliales d'artère coronaire humaine et cet effet est médié par le récepteur P2Y₂ (Seye, Yu et al. 2003). Ceci est la première étude démontrant précisément l'implication d'un sous-type de récepteur P2Y dans l'exposition de molécules adhésives endothéliales. La structure et le rôle des molécules adhésives endothéliales seront évoqués à la page 46. Cette même équipe scientifique, dans une récente étude (Seye, Yu et al. 2004), a mis en évidence que la stimulation du récepteur P2Y₂ dans des cellules endothéliales entraîne son interaction avec un des récepteurs au VEGF, le récepteur KDR/Flk-1, la phosphorylation de protéines GTPases de la famille Rho (RhoA et Rac1) et enfin, l'expression de la molécule VCAM-1. Ces résultats illustrent un nouveau mécanisme par lequel un récepteur P2Y interagit avec un récepteur à activité tyrosine-kinase pour engendrer une réponse inflammatoire au niveau de la cellule endothéliale.

Il a aussi été démontré que la quantité d'ARNm codant pour la molécule d'adhésion endothéliale E-sélectine est augmentée après l'activation de cellules endothéliales en culture par de l'ATP, l'ADP et l'ATP γ S (von Albertini, Stroka et al. 1997; von Albertini, Palmethofer et al. 1998; Goepfert, Imai et al. 2000). Cependant, les concentrations utilisées pour ces stimulations (de l'ordre du mM) ainsi que l'absence d'utilisation d'agonistes et/ou d'antagonistes spécifiques, ne permettent pas de conclure sur l'implication des récepteurs P2X et/ou P2Y dans cette réponse.

Les mécanismes régulant l'apoptose des cellules endothéliales : implication des nucléotides extracellulaires

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins ou inversement, la régression de vaisseaux préexistants, observées physiologiquement et dans certaines pathologies, sont des processus dépendants de la balance entre la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales (Carmeliet 2003). Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un processus de mort cellulaire extrêmement régulé, sous la dépendance de l'environnement dans lequel se trouve la cellule. La survie de la cellule endothéliale est régulée par différents mécanismes

antiapoptotiques dont les principaux sont : i) son interaction avec les cellules endothéliales environnantes ; ii) son interaction avec les éléments de la matrice extracellulaire et les facteurs de croissance ; iii) le flux sanguin (Mallat and Tedgui 2000).

Les nucléotides semblent également être impliqués dans ces régulations. En effet, il a été démontré que de grandes concentrations d'ATP et d'ADP (de l'ordre du mM) induisent l'apoptose dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaine et bovine (Dawicki, Chatterjee et al. 1997) et que cet effet est dû à leur conversion en adénosine par les différentes enzymes ou ectonucléotidases présentes à la surface de ces cellules. Les auteurs de cette étude postulent que ceci est la conséquence du transport de l'adénosine, *via* un échangeur membranaire, dans le milieu intracellulaire où elle interfère avec des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN (processus qui protège l'ADN de sa dégradation par des nucléases). Des études sur des cellules endothéliales bovines, humaines et de porc, ont suggéré un rôle du récepteur P2X₇ dans l'apoptose induite par l'ATP. Par stimulation directe des cellules endothéliales par de l'ATP (von Albertini, Palmetshofer et al. 1998; Goepfert, Imai et al. 2000) ou après leur activation par du LPS ou du lipooligosaccharide (induisant la sécrétion d'ATP), le récepteur P2X₇ stimule la protéine caspase-8 menant à l'apoptose de ces cellules (Sylte, Kuckleburg et al. 2005). Ces résultats suggèrent donc que, l'effet proapoptotique des nucléotides extracellulaires sur les cellules endothéliales pourrait résulter d'une action *via* un ou plusieurs récepteurs P2 membranaires mais également, *via* leur conversion en adénosine. Ceci est un excellent exemple de la complexité de la régulation et de l'action des nucléotides extracellulaires.

3. L'ectoenzyme CD39

Les effets médiés par les nucléotides extracellulaires sont modulés par des ectoenzymes appelées ectonucléotidases, qui lient et hydrolysent ces nucléotides pour aboutir à la formation d'adénosine (**figure 4a**). De part cette activité d'hydrolyse, les ectonucléotidases empêchent une action prolongée des nucléotides sur les récepteurs P2 des cellules vasculaires et elles permettent aussi la resensibilisation de ces récepteurs suite à leur activation. Il existe une multitude d'enzymes hydrolysant des nucléotides et leur nomenclature ainsi que leurs réactions catalytiques exercées sont bien définies (Zimmermann 2000; Salmi and Jalkanen 2005). Les membres de la famille des ectonucléoside triphosphate

diphosphohydrolases (E-NTPDase) hydrolysent les nucléosides 5'-triphosphates et 5'-diphosphates.

Des nucléotides sont présents dans le milieu extracellulaire *via* la lyse cellulaire, le transport transmembranaire et l'exocytose de granules. Les principales cellules sources de ces nucléotides dans un vaisseau sanguin sont les cellules endothéliales, les leucocytes et les plaquettes sanguines (Di Virgilio and Solini 2002; Robson, Wu et al. 2005). Les cellules endothéliales sécrètent de l'ATP en réponse à des forces de cisaillement élevées (Bodin, Bailey et al. 1991) ou en réponse à des agonistes comme la bradykinine, la sérotonine, l'acétylcholine et l'ADP (Yang, Cheek et al. 1994). Les leucocytes représentent une source non négligeable d'ATP extracellulaire lors de leur activation par des médiateurs de l'inflammation tels que le LPS (Di Virgilio and Solini 2002). La majeure partie de l'ATP et de l'ADP extracellulaires provient de la sécrétion du contenu des granules denses des plaquettes sanguines activées. En effet, ces granules renferment près d'un demi molaire de chacun de ces nucléotides (Meyers, Holmsen et al. 1982; Reimers 1985) qui, une fois sécrétés, activent les récepteurs P2 présents à la surface endothéliale, des cellules musculaires lisses, des leucocytes et des plaquettes sanguines elles-mêmes.

3.1. Structure et localisation

Parmi les cinq sous-types de E-NTPDase identifiés, se trouvent le CD39 (NTPDase-1) qui hydrolyse les nucléosides 5'-triphosphates et 5'-diphosphates (ATP et ADP hydrolysés en AMP), et le CD39L1 (NTPDase-2) qui hydrolyse les nucléosides 5'-triphosphates (ATP hydrolysé en ADP) (Robson, Wu et al. 2005). L'ectoenzyme CD39 possède deux domaines transmembranaires, des extrémités N- et C-terminales intracellulaires et une grande boucle extracellulaire contenant cinq domaines apyrase conservés, responsables de son activité catalytique (**figure 4b**) (Zimmermann 2000). Ces domaines catalytiques ont été nommés « apyrase », du nom de l'enzyme isolée à partir de pomme de terre et possédant une activité d'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP en AMP. Alors que l'expression de l'enzyme CD39L1 est retrouvée au niveau des péricytes et des cellules du stroma, l'enzyme CD39 est localisée au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (Kaczmarek, Koziak et al. 1996; Marcus, Broekman et al. 1997; Sevigny, Levesque et al. 1997; Sevigny, Sundberg et al. 2002). Le CD39 a été initialement caractérisé comme un marqueur d'activation et d'identification de monocytes, de lymphocytes B et T et de certains lymphocytes NK

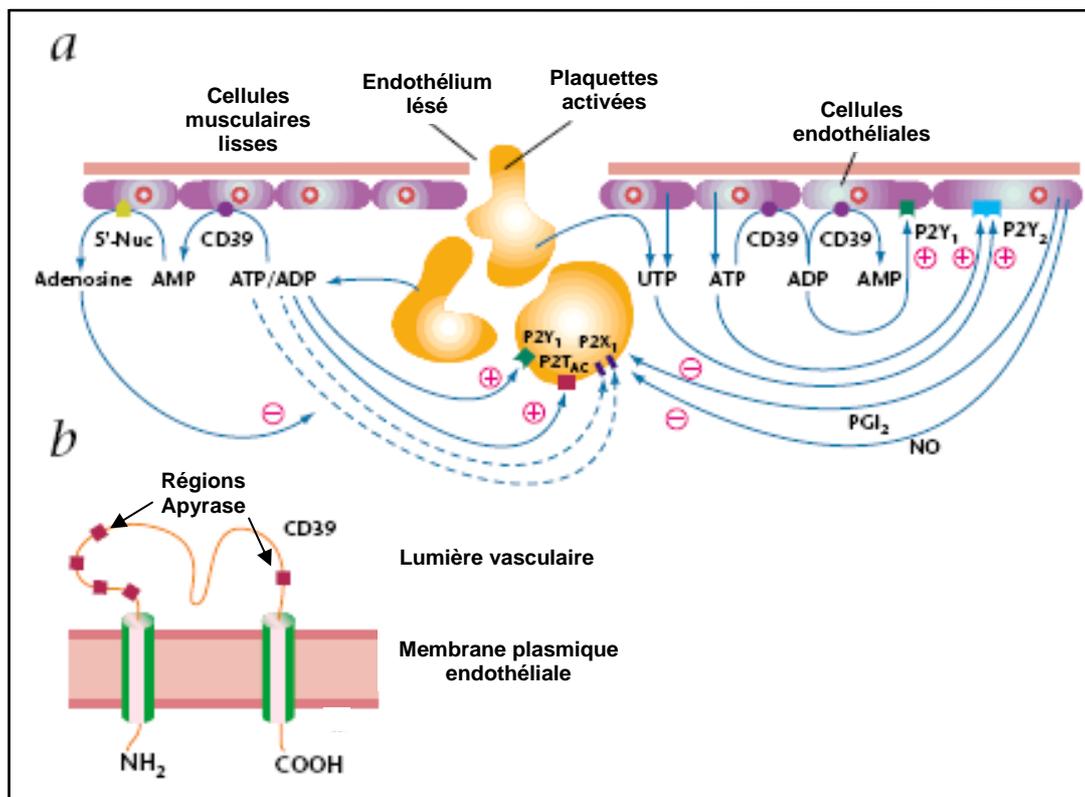
(Kansas, Wood et al. 1991; Favalaro 1993; Maliszewski, Delespesse et al. 1994). Au niveau endothélial, le CD39 est exprimé au niveau de cavéoles où il a été démontré colocalisé avec le récepteur P2Y₁, suggérant une étroite régulation de l'activation de ce récepteur par le CD39 (Kittel, Kaczmarek et al. 1999; Kittel, Csapo et al. 2004). D'ailleurs, au niveau des cavéoles endothéliales, cet enzyme pourrait réguler d'autres récepteurs P2Y, puisqu'une étude a suggéré la présence des récepteurs P2Y₂ et P2Y₄, en plus du récepteur P2Y₁, dans ces domaines membranaires riches en cholestérol (Kaiser, Oxhorn et al. 2002).

3.2. Fonctions

Au niveau de la cellule endothéliale, le CD39 participe au maintien de la non-thrombogénicité de sa surface par son activité d'hydrolyse des faibles quantités de nucléotides sécrétés constitutivement par les cellules vasculaires. De plus, lors d'une lésion vasculaire où de fortes quantités de nucléotides sont libérées dans le plasma, il limite l'agrégation des plaquettes circulantes en dégradant l'ATP et l'ADP en AMP (Kaczmarek, Koziak et al. 1996; Marcus, Broekman et al. 1997). Le CD39, en action concertée avec une autre enzyme présent à la surface endothéliale, la 5'-ectonucléotidase (CD73), qui dégrade l'AMP en adénosine à la surface endothéliale, permet de limiter les effets des nucléotides extracellulaires dans le milieu (Kawashima, Nagasawa et al. 2000). Ainsi, ces deux enzymes jouent un rôle dans la régulation de la thrombose. D'ailleurs, des souris KO CD39 ont été générées et elles présentent une diminution de la taille des thrombi dans un modèle de thrombose induite au FeCl₃ dans des artères mésentériques, ainsi qu'un défaut d'agrégation plaquettaire à l'ADP et à d'autres agonistes (Enjyoji, Sevigny et al. 1999).

Le CD39 participe également à la régulation de l'inflammation en contrôlant l'activation des intégrines leucocytaires, des molécules adhésives endothéliales et de la perméabilité de l'endothélium (Salmi and Jalkanen 2005). En effet, l'accumulation de nucléotides plasmatiques, responsable de l'augmentation de l'expression de l'intégrine Mac-1 (Oryu, Sakamoto et al. 1996; Goepfert, Sundberg et al. 2001), de la sécrétion de chimiokines (IL-8) (Warny, Aboudola et al. 2001) et des cytokines TNF α et l'IL-1 β par les leucocytes (Di Virgilio and Solini 2002), est régulée par le CD39. Le rôle de l'enzyme CD39 a aussi été mis en évidence dans un modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel chez la souris. Dans ce modèle, les souris KO CD39 présentent une absence totale de migration cellulaire et de formations de vaisseaux sanguins dans le gel (Goepfert, Sundberg et al. 2001).

Son activité enzymatique est soumise à des variations lors de l'activation des cellules endothéliales. Il a été observé une diminution de son activité lors de l'activation *in vitro* de cellules endothéliales par des radicaux libres et par du TNF α (Robson, Kaczmarek et al. 1997) et une diminution de son expression, *in vivo*, au niveau des glomérules de rein transplanté (van Son, Wit et al. 1997). Ces observations illustrent que l'activité du CD39 est dépendante du contexte dans lequel se trouve le système vasculaire et que ceci peut prolonger l'action des nucléotides dans le milieu.



D'après (Zimmermann 1999).

Figure 4 : Structure et rôle de l'ectoenzyme CD39 dans l'hémostase.

a) Lors d'une lésion vasculaire, de grandes quantités de nucléotides sont libérées dans le plasma par la sécrétion du contenu des granules denses des plaquettes sanguines activées et par les cellules endothéliales lésées. Ces nucléotides, en activant les récepteurs plaquettaire P2Y₁, P2Y₁₂ et P2X₁, contribuent à l'amplification de l'agrégation des plaquettes circulantes afin de former le clou hémostatique. Au niveau endothélial, les nucléotides permettent la sécrétion de NO et de PGI₂, via l'activation des récepteurs P2Y₁ et P2Y₂, afin d'inhiber la progression du thrombus et de permettre la vasodilatation. Enfin, le CD39 régule l'ensemble de ces mécanismes en dégradant les nucléotides 5'-triphosphates et 5'-diphosphates avec la formation d'AMP, puis d'adénosine par l'enzyme CD73 (5'-Nuc).

b) Schéma topographique de la structure et de l'ancrage membranaire du CD39 au niveau endothélial. Le CD39 possède deux domaines transmembranaires et une grande boucle extracellulaire qui contient les cinq régions apyrase à activité catalytique.

B. L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement à partir de vaisseaux préexistants (Carmeliet 2003). Ce processus implique la migration et la prolifération de cellules endothéliales et non endothéliales telles que les péricytes et les cellules musculaires lisses dont le résultat est la morphogenèse d'un arbre vasculaire complexe et fonctionnel. Chez l'adulte, le renouvellement endothélial est très lent (de l'ordre du mois à l'année) et ceci résulte d'un équilibre entre les régulateurs endogènes positifs et négatifs de l'angiogenèse. La croissance de nouveaux vaisseaux sanguins s'observe physiologiquement lors du remodelage tissulaire cyclique au niveau de l'utérus, lors de la réparation tissulaire suite à une lésion ou lors des maladies ischémiques du myocarde ou des membres inférieurs. La rupture de l'équilibre entre les différents régulateurs est souvent synonyme d'angiogenèse pathologique. En effet, un excès ou un défaut d'angiogenèse est impliqué dans de nombreuses et différentes pathologies telles que la rétinopathie diabétique, le psoriasis, ou des maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde (Ferrara and Alitalo 1999; Carmeliet 2003). De plus, la croissance tumorale et la dissémination métastatique sont des phénomènes largement dépendant de l'angiogenèse ce qui explique le développement important de molécules antiangiogéniques dans le traitement de certains cancers (Folkman 1995; Hanahan 1998). En effet selon les travaux de Judah Folkman, une tumeur ne peut pas croître au-delà d'un certain volume si elle n'est pas correctement vascularisée. Le centre de la tumeur en cours de croissance est soumis à une hypoxie qui s'accompagne de phénomènes de nécrose. Les cellules tumorales répondent à cette hypoxie « nécosante » en produisant des facteurs angiogéniques comme le VEGF et l'IL-8. Ces différents facteurs vont permettre la croissance des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et ainsi participer à la création d'un nouveau réseau vasculaire permettant d'apporter oxygène et nutriments aux cellules tumorales. Les cellules endothéliales vasculaires sont les principaux acteurs de ce processus, mais les autres composants des vaisseaux tels que les péricytes, les cellules musculaires lisses ou la matrice extracellulaire interviennent également.

Dans cette partie générale consacrée à l'angiogenèse, les différentes étapes menant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ainsi que les cellules et les facteurs impliqués dans ce processus seront abordés.

1. Les mécanismes de formation des vaisseaux sanguins

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins fonctionnels s'observe dès la mise en place de l'embryon et perdure durant toute la vie adulte. Lors du développement embryonnaire, la formation du système vasculaire débute par la vasculogénèse qui permet d'établir un réseau primitif de vaisseaux sanguins pour la vascularisation des organes. Il résulte de la différenciation *in situ* de précurseurs (les angioblastes) en cellules endothéliales, qui se multiplient et s'organisent en tubes fonctionnels (Pepper 2000; Conway, Collen et al. 2001). Ensuite, la croissance, l'expansion et le remodelage de ce plexus primitif en un réseau mature représentent l'angiogénèse.

Les principales étapes et mécanismes moléculaires observés durant l'angiogénèse sont : l'activation des cellules endothéliales, la vasodilatation et la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales et enfin, leur assemblage en tube et la formation d'une lumière vasculaire. L'enchaînement de ces différentes étapes est abordé ci-dessous et illustré à la **figure 5**. Le tableau situé en page 34 est un récapitulatif des différents facteurs angiogéniques identifiés et dont la fonction a été caractérisée. Ce tableau contient également une description des principaux facteurs régulant les étapes de l'angiogénèse.

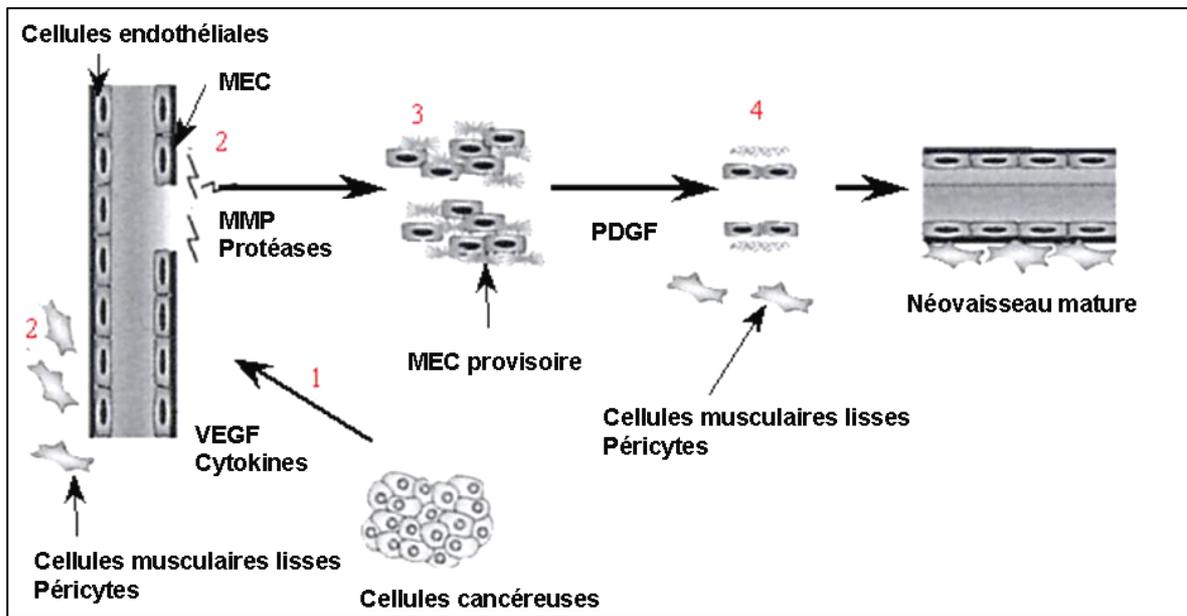


Figure 5: Schéma des différentes étapes menant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en réponse à une tumeur par exemple.

1 : Activation des cellules endothéliales par des facteurs de croissance (VEGF) ou par des cytokines sécrétés par les cellules tumorales. **2 :** Détachement des cellules musculaires lisses et des péricytes et dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par les MMP et les protéases endothéliales. **3 :** Prolifération et migration des cellules endothéliales selon des gradients de concentration des facteurs sécrétés. **4 :** Formation d'un tube avec une lumière vasculaire, puis stabilisation de celui-ci par le recrutement et l'association de cellules musculaires lisses et de péricytes en réponse au PDGF.

Activation des cellules endothéliales, vasodilatation et dégradation de la matrice

Suite à une lésion vasculaire, une ischémie ou lors de la multiplication de cellules cancéreuses, de nombreux facteurs (cytokines, facteurs de croissance, nucléotides en grande concentration) sont sécrétés dans le milieu où ils activent les récepteurs P2 présents à la surface des cellules vasculaires, dont les cellules endothéliales. En réponse, ces cellules passent d'un état de quiescence à un état activé caractérisé par exemple, par la sécrétion de VEGF, d'angiopoïétine-2 et d'agents vasodilatateurs (NO/PGI₂). Ces facteurs entraînent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire par la redistribution de molécules situées dans les zones de contact entre les cellules endothéliales, comme PECAM-1 et VE-cadhérine (Gale and Yancopoulos 1999). Ceci permet la pénétration de protéines plasmatiques et l'activation des cellules musculaires lisses et des péricytes sous-jacents qui perdent leur adhérence avec la matrice extracellulaire, permettant ainsi la migration des

cellules endothéliales activées (Gale and Yancopoulos 1999). Plus d'une vingtaine de métalloprotéinases (MMP) différentes, accompagnées d'autres protéases comme l'urokinase-type activateur du plasminogène (u-PA), sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules endothéliales (Nelson, Fingleton et al. 2000). Ces enzymes jouent donc un rôle majeur dans la migration des cellules endothéliales activées (Conway, Collen et al. 2001).

Prolifération et migration des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales, détachées de leur matrice extracellulaire, prolifèrent et migrent selon des gradients de concentration de facteurs tels que le VEGF, le FGF, le PDGF, et des chimiokines CXC sécrétés par des cellules de l'inflammation (polynucléaires, macrophages) ou des cellules tumorales par exemple. Ces facteurs sont responsables de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales mais ils exercent également des fonctions plus spécialisées. Les isoformes de la famille FGF sont chimiotactiques et mitogéniques pour les cellules endothéliales et ils permettent aussi d'amplifier le recrutement de cellules inflammatoires (Conway, Collen et al. 2001; Distler, Hirth et al. 2003). Le facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines (PDGF-BB) stimule la prolifération des cellules endothéliales, le bourgeonnement et la formation de tubes *in vitro* (Distler, Hirth et al. 2003). Concernant les différents membres de la famille VEGF, leurs effets sur la prolifération, la migration et l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales ont été clairement établis (Veikkola, Karkkainen et al. 2000; Distler, Hirth et al. 2003).

Assemblage des cellules endothéliales en tube et formation d'une lumière vasculaire

Durant leur migration, les cellules endothéliales s'organisent progressivement entre elles afin de former une monocouche cellulaire délimitant une lumière vasculaire. Cette organisation nécessite deux événements cruciaux : un contact entre les cellules endothéliales et l'ancrage des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire.

L'établissement de contacts entre les cellules endothéliales est réalisé par des molécules spécialisées comme PECAM-1, VE-cadhérine et des protéines de la famille des connexines (Dejana 2004). L'ancrage des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire est dépendant d'intégrines telles que $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$, qui permettent la localisation des MMP à la surface endothéliale et participent ainsi à la formation de la lumière vasculaire (Carmeliet 2000). Finalement, le nouveau vaisseau formé est ensuite stabilisé par des cellules murales dont l'origine provient de cellules mésenchymateuses du tissu environnant qui, sous

l'effet de facteur sécrété comme le PDGF, prolifèrent, migrent au niveau sous-endothélial et se différencient en péricytes et/ou en cellules musculaires lisses. Cette association entre les péricytes et les cellules musculaires lisses stabilise le nouveau vaisseau sanguin formé et elle contrôle également la prolifération et la survie des cellules endothéliales ainsi que la perméabilité vasculaire (Carmeliet 2000).

2. Les facteurs antiangiogéniques

Dans la description des mécanismes de formation des vaisseaux sanguins abordée plus haut, le rôle des principaux facteurs angiogéniques et des protéines associées a été décrit. Durant les différentes étapes de l'angiogenèse, des facteurs inhibiteurs sont générés afin de limiter la réponse angiogénique (**tableau, page 34**) et leurs origines sont diverses. Lors de l'activation plaquettaire, le contenu des granules α est sécrété, riche en activateurs mais aussi, en inhibiteurs de l'angiogenèse tels que la thrombospondine-1 (TSP-1), le facteur plaquettaire 4 (PF4), l'angiostatine, l'inhibiteur d'u-PA (PAI-1), les inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP) et le TGF- β 1 (Browder, Folkman et al. 2000; Rendu and Brohard-Bohn 2001; Staton and Lewis 2005). Tous ces facteurs ont pour effet d'inhiber la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Browder, Folkman et al. 2000; Conway, Collen et al. 2001; Staton and Lewis 2005).

Une autre source de composés régulant l'angiogenèse est représentée par des produits de dégradation de facteurs intervenant dans la cascade de la coagulation. En effet, la dégradation du kininogène de haut poids moléculaire ainsi que du complexe thrombine-antithrombine (TAT) génère des fragments capables d'inhiber l'angiogenèse *in vivo* et la prolifération de cellules endothéliales *in vitro* (O'Reilly, Pirie-Shepherd et al. 1999; Colman, Jameson et al. 2000). Un autre exemple est la voie de la fibrinolyse qui permet la dégradation du caillot sanguin formé. Elle génère également un puissant inhibiteur de l'angiogenèse : l'angiostatine. Il résulte de la dégradation du plasminogène par différentes protéases comme les MMP et il inhibe la prolifération, la migration et la formation en tubes des cellules endothéliales *in vitro* ; son effet antiangiogénique a également été démontré dans plusieurs modèles *in vivo* (O'Reilly, Holmgren et al. 1994; Cao, Ji et al. 1996).

Facteurs pro- et antiangiogéniques					
Proangiogéniques	Fonctions	Références	Antiangiogéniques	Fonctions	Références
famille des VEGF	↑ perméabilité vasculaire ↑ prolifération, migration CE ↓ apoptose CE essentielle dans l'angiogenèse <i>in vivo</i>	Pepper 1991, Kohn 1992, Ferrara 1998, Veikkola 2000	Angiopoiétine-2	en l'absence de facteurs proangiogéniques: déstabilisation du vaisseau néoformé par antagonisme de l'angiopoiétine-1	Gale 1999, Lobov 2002
famille des FGF	↑ prolifération, migration CE ↑ angiogenèse <i>in vivo</i>	Pepper 1992, Carmeliet 2000	Thrombospondine-1, Thrombospondine-2	↓ migration, adhésion des CE ↑ apoptose CE inhibent l'angiogenèse <i>in vivo</i>	Bagavandoss 1990, Iruela-Arispe 1999, Streit 1999
PDGF-BB	↑ formation de tubes par les CE ↑ prolifération et recrutement CML et PC stabilise le vaisseau néoformé	Battegay 1994, Lindahl 1999			
Angiopoiétine-1	stabilise le vaisseau néoformé	Suri 1996, Gale 1999	Angiostatine, Endostatine	↓ prolifération, migration des CE ↑ apoptose CE inhibent l'angiogenèse <i>in vivo</i>	O'Reilly 1994, O'Reilly 1997, Claesson-Welsh 1998
Angiopoiétine-2	↑ prolifération, migration CE ↑ bourgeonnement des CE	Gale 1999			
HGF	↑ prolifération, migration CE et CML	Shima 1991	Facteur plaquettaire-4	↓ prolifération, migration des CE inhibe l'angiogenèse <i>in vivo</i> neutralise le VEGF et FGF-2	Maione 1990, Perollet 1998
TGF-β (faible concentration)	↑ formation de tubes par les CE stabilise le vaisseau néoformé par stimulation de production de protéines de MEC	Pepper 1997			
chimiokines CXCL	↑ prolifération, migration CE ↑ angiogenèse <i>in vivo</i>	Belperio 2000	TGF-β (haute concentration)	↓ prolifération, migration des CE ↑ apoptose CE ↑ production de TIMPs	Gohongi 1999
PECAM-1	↑ formation de tubes par les CE ↑ migration CE stabilise le vaisseau néoformé par formation de jonctions inter-CE	DeLisser 1997, Cao G 2002			
VE-Cadhérine	stabilise le vaisseau néoformé par formation de jonctions inter-CE essentielle dans l'angiogenèse <i>in vivo</i>	Corada 1999	TIMPs	inhibent l'activité des MMPs	Brew 2000
Intégrines α _v β ₃ , α _v β ₅ et α ₅ β ₁	↑ migration CE ↑ adhésion CE sur MEC ↓ apoptose CE récepteurs aux MMP	Varner 1995, Eliceiri 1999	Fragments complexe TAT, Fragments kinogène de haut poids moléculaire	↓ prolifération, migration des CE inhibent l'angiogenèse <i>in vivo</i>	O'Reilly 1999 Colman 2000
MMPs, Activateurs du plasminogène	↑ migration CE par dégradation MEC libèrent VEGF et FGF-2 de la MEC	Nelson 2000			
NO	↑ perméabilité vasculaire	Loscalzo 1995			

CE=cellules endothéliales; CML=cellules musculaires lisses; PC=péricytes; MEC=matrice extracellulaire; VEGF=facteur de croissance vasculaire endothélial; FGF=facteur de croissance des fibroblastes; PDGF=facteur de croissance dérivé des plaquettes; HGF=facteur de croissance hépatocytaire; TGF-β=facteur de croissance transformant β; PECAM-1=molécule d'adhésion plaquettaire et endothéliale 1; VE-cadhérine=cadhérine vasculaire endothéliale; MMPs=métalloprotéinases de la matrice; TIMPs=inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases; TAT=thrombine-antithrombine

3. Les modèles d'étude *in vivo* de l'angiogenèse

Afin d'identifier et de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant l'angiogenèse, mais aussi, d'étudier les effets engendrés par un composé angiogénique ou antiangiogénique donné, il est nécessaire d'avoir recours à plusieurs modèles *in vitro* et/ou *in vivo*. Bien que la prolifération, la migration, la différenciation et l'organisation des cellules endothéliales en vaisseaux soient des processus centraux de la réponse angiogénique, d'autres éléments sont nécessaires au bon déroulement de ces événements comme la présence des cellules musculaires lisses, des péricytes, des cellules sanguines circulantes mais aussi, de la matrice extracellulaire. L'utilisation de modèles d'étude *in vivo* présente l'avantage de recréer cet environnement complexe et la plupart d'entre eux permet de tirer profit des souris transgéniques et des progrès réalisés dans l'imagerie *in vivo* pour la quantification.

De nombreux modèles *in vivo* ont été développés afin d'étudier l'angiogenèse et les plus maîtrisés et utilisés sont les suivants :

Le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet (CAM)

C'est probablement le modèle *in vivo* le plus souvent utilisé pour l'identification de composés angiogéniques ou antiangiogéniques (Nguyen, Shing et al. 1994; Ribatti, Vacca et al. 1996). Il consiste à implanter, dans la membrane chorio-allantoïdienne d'un œuf, le composé à tester et la réponse angiogénique peut être évaluée, au cours du temps, par le comptage des nouveaux vaisseaux sanguins formés, à l'aide d'un microscope. L'accès à la membrane chorio-allantoïdienne se fait, soit après avoir découpé une partie de la coquille de l'œuf, soit après avoir transféré son contenu dans une boîte de Pétri (**figure 6**). Le composé à tester est, soit enrobé dans des capsules de polymères permettant une lente diffusion du produit, soit mis en contact sur des inserts en plastique et séché à l'air.

L'intérêt de ce modèle réside dans sa simplicité, son faible coût d'utilisation et la rapidité d'obtention des résultats. Le principal inconvénient est qu'il existe déjà un réseau vasculaire au sein de la membrane et qu'il est alors difficile de distinguer les nouveaux vaisseaux formés de ceux préexistants. De plus, après une semaine d'utilisation, il peut exister une réponse inflammatoire de la membrane suite à la cassure de la coquille, ce qui interfère avec l'effet du composé testé.

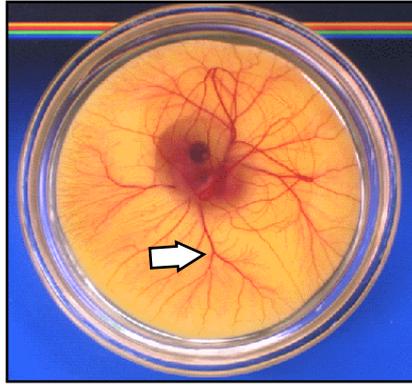


Figure 6: Le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet.

Par transparence, on peut observer et analyser les vaisseaux sanguins néoformés (flèche blanche) dans la membrane chorio-allantoïdienne d'un œuf de poulet mis dans une boîte de Pétri.

Le modèle d'angiogenèse de la cornée

Dans ce modèle, une incision est effectuée dans la cornée de l'animal (lapin, rat ou souris), puis un implant de polymère, contenant le facteur angiogénique étudié et permettant sa lente diffusion au sein de l'organe, y est implanté (**figure 7**). La réponse angiogénique obtenue est appréciée grâce à l'injection, dans la circulation sanguine de l'animal, d'un produit de contraste ou de billes de dextran fluorescentes, suivie de l'analyse avec un microscope couplé à un ordinateur (Presta, Rusnati et al. 1999). Ce modèle permet également d'identifier des molécules ayant une propriété antiangiogénique. En effet, l'animal est perfusé du composé à tester et l'inhibition de l'angiogenèse dans la cornée est appréciée.

Le principal avantage de ce modèle est que la cornée est initialement un site avasculaire et que, par conséquent, les vaisseaux sanguins observés résultent de la réponse angiogénique (Muthukkaruppan and Auerbach 1979). Cependant, son application chez la souris ou le rat requiert de bonnes pratiques chirurgicales.

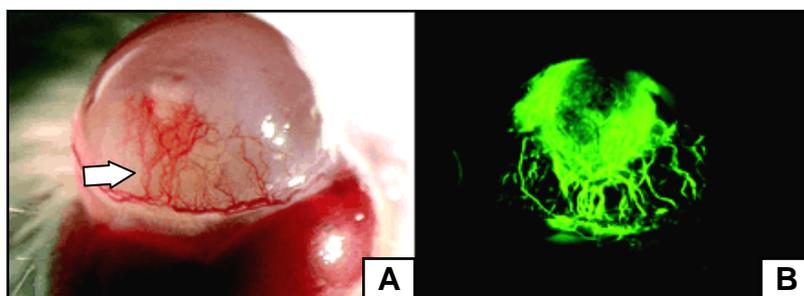


Figure 7: Le modèle d'angiogenèse de la cornée.

A : Formation de vaisseaux sanguins (flèche blanche) dans la cornée de souris.

B : Identification des vaisseaux sanguins néoformés dans la cornée après l'injection de billes de dextran fluorescentes.

Les modèles avec chambre

Ces modèles consistent en l'implantation de chambres transparentes, soit dans l'oreille chez le lapin, soit sous la peau du dos ou dans le crâne chez la souris (**figure 8**). Un morceau de peau ou d'os du crâne de l'animal anesthésié est retiré, puis des cellules tumorales ou un gel contenant un ou plusieurs composés angiogéniques sont injectés sur la surface exposée. La plaie est ensuite recouverte d'un morceau de verre et le tout est scellé.

Le principal intérêt de ce modèle réside dans le fait que la croissance tridimensionnelle des vaisseaux sanguins peut être analysée par transparence, en continue et au cours du temps. Il permet aussi la mesure systématique et continue de paramètres tels que la pression sanguine ou le diamètre des vaisseaux néoformés (Jain, Schlenger et al. 1997). Comme le modèle d'angiogenèse dans la cornée, ce modèle permet également d'identifier des molécules ayant une propriété antiangiogénique grâce à la perfusion du produit à tester chez l'animal.

Ce modèle a permis de mettre en évidence l'importance de l'angiogenèse dans la croissance tumorale, la transplantation et la réparation tissulaire. Cependant, il est assez traumatisant pour l'animal et demande un suivi et une expertise technique importante.

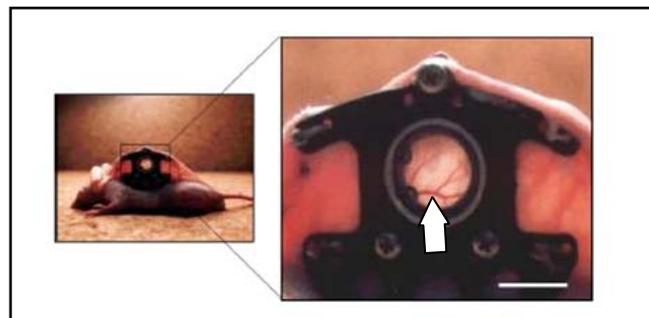


Figure 8: *Le modèle avec chambre.*

Vaisseaux sanguins néoformés (flèche blanche) obtenus dans une chambre transparente placée sous la peau du dos d'une souris.

Le modèle d'ischémie-reperfusion

Lors de l'occlusion ou la rupture des vaisseaux sanguins irrigant un organe, celui-ci est privé d'apport sanguin ; il est en hypoxie. Les cellules et les tissus le composant subissent des changements importants qui entraînent des perturbations dans les voies de signalisation et d'expression des protéines. Selon la durée et la sévérité de l'ischémie, des produits toxiques s'accumulent dans le cytosol induisant la mort cellulaire et la perte de fonction de l'organe. Durant l'ischémie, la formation de radicaux libres est responsable du recrutement et de l'adhérence des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales (Milhoan, Lane et al. 1992). La transmigration des neutrophiles puis leur activation dans les tissus ischémiés contribue à la dégradation du tissu lésé. Lors de la reperfusion des vaisseaux sanguins, les métabolites toxiques générés durant l'ischémie sont dispersés dans la circulation sanguine et affectent les fonctions d'autres organes contribuant ainsi à la dégradation de l'état général.

Le modèle d'ischémie-reperfusion consiste essentiellement en la ligature des vaisseaux sanguins fémoraux chez une souris, puis leur reperfusion quelques heures plus tard. L'animal est ensuite sacrifié et les tissus de la patte sont prélevés et analysés. L'état de dégradation du tissu ischémié est apprécié par des techniques histologiques et d'immunomarquage, et la formation de vaisseaux sanguins collatéraux à ceux ligaturés est quantifiée. Une alternative à ce procédé consiste à suivre, en temps réel, chez l'animal éveillé, la diminution du débit sanguin dans le vaisseau ligaturé mais également, d'évaluer la néovascularisation du tissu ischémié par la mesure du débit sanguin dans les néovaisseaux collatéraux. Ceci est réalisé à l'aide de l'imagerie couplée à un Doppler. Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle bénéfique du VEGF dans la survie du tissu ischémié. En effet, son administration continue augmente le débit sanguin collatéral chez des animaux ou des humains, dans les ischémies fémorale et myocardique (Vale, Isner et al. 2001).

Les modèles d'implants

Ces modèles consistent à l'implantation, sous la peau de l'animal anesthésié, d'une matrice, sous forme d'un gel, qui est composée de polymères ou de protéines de la membrane basale. Préalablement à l'injection, des cellules tumorales ou des facteurs angiogéniques ont été ajoutés à la matrice afin d'induire une réponse angiogénique (Plunkett and Hailey 1990; Passaniti, Taylor et al. 1992). Après quelques jours, la matrice est prélevée et analysée histologiquement afin d'apprécier le nombre et la qualité des vaisseaux sanguins néoformés ainsi que le contenu cellulaire et la migration. La réponse angiogénique obtenue varie

beaucoup selon la composition de l'implant et des facteurs angiogéniques ajoutés. Ces modèles ont l'avantage de permettre l'analyse histologique de la réponse angiogénique obtenue, mais l'implantation de la matrice en elle-même peut engendrer une réponse inflammatoire perturbant ainsi les résultats. Parmi ces modèles, se trouve le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel chez la souris dont la description se situe en page 60.

En conclusion, les modèles d'étude *in vivo* permettent une évaluation globale des processus gouvernant l'angiogenèse mais ils requièrent plus de temps à leur mise en œuvre et à l'analyse des données recueillies que les modèles *in vitro*.

C. La cellule endothéliale : présentation et fonctions

La cellule endothéliale est un composant majeur des vaisseaux sanguins et elle est l'acteur principal de l'angiogenèse. Dans le cadre de la compréhension des mécanismes régulant l'angiogenèse, ce chapitre aborde les grandes fonctions de la cellule endothéliale dans le système vasculaire que sont la régulation du tonus vasculaire, de l'hémostase et de la thrombose, son rôle de barrière « semi-perméable » entre le sang et les tissus, et l'interaction et le recrutement de cellules sanguines.

Une monocouche de cellules endothéliales borde la lumière de l'ensemble du système vasculaire. Le corps humain adulte contient environ $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$ cellules endothéliales représentant un « organe » d'une masse d'un kilogramme et d'une surface de $1 \text{ à } 7 \text{ m}^2$ (Augustin, Kozian et al. 1994). La structure de la cellule endothéliale et son intégrité fonctionnelle influencent grandement la qualité de la circulation sanguine dans l'arbre vasculaire. La cellule endothéliale résulte de la différenciation de précurseurs, les angioblastes, lors de la mise en place du réseau vasculaire primitif (vasculogenèse) (Carmeliet 2000). L'endothélium a été pendant très longtemps considéré comme une simple membrane inerte délimitant le système vasculaire mais les observations successives de Heidenhahn en 1891 et de Gowan en 1959 ont démontré qu'il était capable d'exercer des fonctions sécrétoires et d'interagir avec des cellules sanguines circulantes (Cines, Pollak et al. 1998). Malgré son aspect de barrière, l'endothélium est perméable à de nombreuses molécules circulantes dans le sang dont il régule le passage par deux moyens : d'une part, grâce à des récepteurs membranaires présents à sa surface, du côté apical, et d'autre part, grâce à des protéines de jonction situées au niveau des jonctions basolatérales. De part sa localisation à l'interface entre les éléments circulants du sang et les tissus sous-jacents, et de part ses fonctions autocrines, paracrines et endocrines, elle joue ainsi un rôle majeur dans le fonctionnement du système vasculaire.

La grande particularité de la cellule endothéliale est illustrée par l'existence d'un large répertoire phénotypique différent selon leur territoire vasculaire. En effet, selon l'endroit, elle exprime différents marqueurs de surface et récepteurs, et elle peut ainsi engendrer des réponses différentes à un même stimulus (Aird 2003; Gebb and Stevens 2004). De plus, des cellules endothéliales provenant d'un territoire vasculaire identique présentent des réponses

variables. Ces différences sont illustrées entre des cellules endothéliales *in vivo* et des cellules mises en culture ; ce point sera abordé en page 54.

Le rôle majeur de la cellule endothéliale est de maintenir la non-thrombogénicité de l'endothélium mais elle participe également à la régulation du tonus vasculaire et l'adhérence des cellules sanguines circulantes. Le dérèglement de ces fonctions est à l'origine de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, l'hypertension et celles liées à l'inflammation.

1. Régulation du tonus et de la perméabilité vasculaires

L'endothélium sécrète des substances qui régulent le tonus vasculaire. La cellule endothéliale contribue à la régulation de la pression sanguine et du flux sanguin par la sécrétion de deux types de composés : des facteurs vasodilatateurs tels que le NO et la prostacycline (PGI₂), et des facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline. Ces facteurs ne sont pas stockés par la cellule endothéliale mais ils résultent, soit d'une synthèse métabolique (NO et PGI₂), soit de la transcription génique (endothéline).

1.1. Le NO

La cellule endothéliale sécrète constitutivement du NO afin de maintenir une vasodilatation basale, mais sa production peut aussi être modulée par des variations de flux sanguin ou par voie pharmacologique (Galley and Webster 2004). La production de NO est réalisée par deux types de NO synthases (NOS) identifiées dans les cellules endothéliales (Govers and Rabelink 2001; Galley and Webster 2004): la eNOS est constitutivement active alors que la iNOS est inducible par des cytokines comme le TNF α . Ces deux enzymes catalysent la transformation de L-arginine en NO avec la formation de L-citrulline. Il a été démontré que l'activité de la eNOS est augmentée suite à l'activation des cellules endothéliales par des agonistes comme la thrombine, l'ADP, la bradykinine mais aussi, en réponse à des forces de cisaillement élevées (Govers and Rabelink 2001). Le NO sécrété par la cellule endothéliale a plusieurs effets au niveau vasculaire (Loscalzo and Welch 1995; Govers and Rabelink 2001). Au niveau des cellules musculaires lisses, il active une enzyme, la guanylate cyclase soluble, qui catalyse la transformation du GTP cytosolique en GMPc. Ainsi, en permettant l'augmentation de la concentration intracellulaire de GMPc, le

NO induit une diminution de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et un relâchement de ces cellules. Au niveau des cellules sanguines circulantes, le NO inhibe les fonctions plaquettaires en prévenant leur activation et leur adhésion au contact de l'endothélium, il réduit l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et il inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses (Garg and Hassid 1989; Loscalzo and Welch 1995).

1.2. La prostacycline

La cellule endothéliale produit la prostacycline (PGI₂) à partir du métabolisme de l'acide arachidonique, présent dans la membrane plasmique. Tout comme le NO, la cellule endothéliale sécrète constitutivement de la PGI₂ pour le maintien d'une vasodilatation de base et cette sécrétion est augmentée en réponse à des facteurs tels que l'ADP, l'ATP et le VEGF (Wilkinson, Purkiss et al. 1993; Galley and Webster 2004). La prostacycline sécrétée active son récepteur IP présent à la surface des cellules musculaires lisses et des plaquettes sanguines (Coleman, Smith et al. 1994) et induit la stimulation d'une adénylate cyclase membranaire et l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC. Son action, en synergie avec le NO, est responsable de la vasorelaxation, de l'inhibition des fonctions plaquettaires et de l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses.

1.3. L'endothéline

Trois endothélines différentes ont été actuellement identifiées, mais seule l'endothéline-1 est produite par la cellule endothéliale (Levin 1995). Une fois synthétisée puis sécrétée, elle active les récepteurs ET-A présents à la surface des cellules musculaires lisses et elle induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium responsable de la contraction de ces cellules (Simonson and Dunn 1990). L'endothéline-1 est le facteur vasoconstricteur le plus puissant identifié de nos jours.

2. Rôle dans l'hémostase et la thrombose

Une des fonctions majeures de l'endothélium est de faciliter le flux sanguin. Pour cela, il maintient la non-thrombogénicité de sa surface afin d'inhiber l'adhésion plaquettaire et la coagulation. Cependant, toute perturbation du flux sanguin, par exemple, des turbulences observées en aval de plaques d'athérome, active la cellule endothéliale. En réponse, celle-ci change de phénotype et expose une surface prothrombogène qui permet le recrutement et l'activation des cellules sanguines.

Il existe un équilibre dynamique entre l'état quiescent (antithrombotique) et l'état activé (prothrombotique) de la cellule endothéliale et il résulte d'une modulation des différents mécanismes impliqués dans ces fonctions.

2.1. Propriétés antithrombotiques

Le contrôle de la génération de thrombine est un élément clé dans l'équilibre entre l'état pro- et antithrombotique de la cellule endothéliale. Cette sérine protéase permet l'activation d'enzymes impliqués dans la cascade de la coagulation, mais aussi l'activation des plaquettes sanguines et des cellules endothéliales *via* leurs récepteurs PAR présents à la surface (**figure 9**). Afin de prévenir de toute complication thrombotique, la cellule endothéliale régule la génération et l'activité de la thrombine par différents moyens dont les principaux sont :

- L'expression de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) par la cellule endothéliale. Il se lie au facteur Xa dans le complexe facteur tissulaire/VIIa/Xa et il prévient ainsi la formation de thrombine (Broze 1995).
- L'expression de thrombomoduline à la surface de la cellule endothéliale, qui en se liant à la thrombine, permet l'activation de la protéine anticoagulante C (Esmon and Fukudome 1995). L'activité de la protéine C est augmentée par la protéine S, elle aussi synthétisée par la cellule endothéliale (Fair, Marlar et al. 1986). Ainsi, en liant la thrombine, la cellule endothéliale diminue la quantité de thrombine disponible et elle limite ainsi l'activation des plaquettes, des facteurs V et XIII et la formation de fibrine.

Le maintien de la non-thrombogénicité de l'endothélium dans un vaisseau sanguin sain résulte également de la capacité de la cellule endothéliale à dégrader les traces de nucléotides extracellulaires présents à leur surface afin d'éviter toute activation plaquettaire. La

cellule endothéliale possède à sa surface deux enzymes, le CD39 et la 5'-ectonucléotidase (CD73), qui hydrolysent successivement l'ATP et l'ADP en AMP, puis l'AMP en adénosine, un puissant vasodilatateur. Ainsi, ces deux enzymes régulent l'action de nucléotides dans le milieu (Marcus, Safier et al. 1991; Kaczmarek, Koziak et al. 1996; Zimmermann 2000).

2.2. Propriétés prothrombotiques

Lors d'une lésion vasculaire, les cellules endothéliales situées à proximité de la lésion sont activées et elles contribuent ainsi à l'activation des plaquettes sanguines et à la formation du clou hémostatique dans le but de permettre l'hémostase. Ceci est réalisé grâce à l'exposition d'une surface prothrombogène par la cellule endothéliale activée. Cette surface est alors caractérisée par la présence de facteur tissulaire, de phospholipides anioniques chargés négativement, et de sites de liaison pour des facteurs de la coagulation et la thrombine. L'exposition des phospholipides anioniques négatifs ainsi que des sites de liaison pour les facteurs IX, IXa, X, Xa, et pour la thrombine, contribuent ensemble à l'amplification de la formation de fibrine et du clou hémostatique (Stern, Nawroth et al. 1985).

Le facteur tissulaire est le principal initiateur de la cascade de la coagulation (Edgington, Dickinson et al. 1997) (**figure 9**). Son expression est absente à la surface de la cellule endothéliale non-activée mais son exposition est observée *in vitro*, après une stimulation par la thrombine, des endotoxines ou des cytokines (Nemerson 1995). *In vivo*, son expression est augmentée au niveau de plaques d'athérosclérose et dans des vaisseaux sanguins tumoraux (Contrino, Hair et al. 1996; Hatakeyama, Asada et al. 1997). Son activité est régulée par le TFPI.

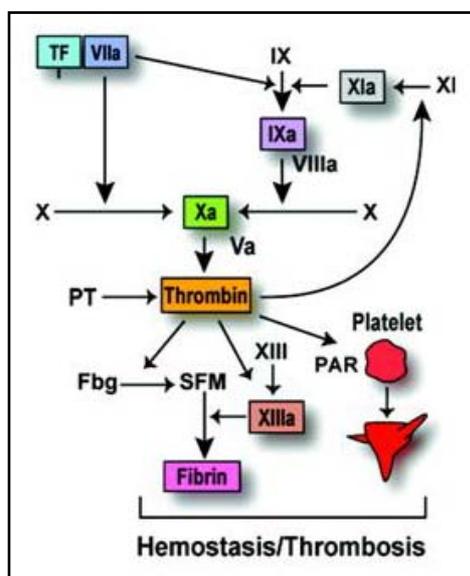


Figure 9: Schéma représentatif de la cascade de la coagulation.

La formation du complexe facteur tissulaire (TF)-facteur VIIa initie la coagulation en activant les facteurs X et IX. Le complexe prothrombinase (facteur Va-facteur Xa) active la prothrombine (PT). Le clivage du fibrinogène (Fbg), par la thrombine, en monomères solubles (SFM) et l'activation des récepteurs PAR des plaquettes sanguines induisent la formation du clou hémostatique. D'après (Mackman 2004).

La cellule endothéliale activée sécrète également une glycoprotéine jouant un rôle important dans l'activation et l'adhésion des plaquettes sanguines lors d'une lésion vasculaire : le facteur de von Willebrand (fvW). La cellule endothéliale représente la principale source de fvW plasmatique (Wagner and Bonfanti 1991) qu'elle sécrète faiblement de façon constitutive mais surtout en réponse à différents agonistes comme les nucléotides et la thrombine (Vischer and Wollheim 1998).

2.3. Régulation de la fibrinolyse

La cellule endothéliale contribue au maintien de la fluidité sanguine en régulant les mécanismes impliqués dans la fibrinolyse. Pour cela, elle dispose de deux procédés :

- La sécrétion constitutive de l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA). Il est nécessaire à l'initiation de la fibrinolyse (Gross and Aird 2000) et son expression est augmentée en réponse à la thrombine (van den Eijnden-Schrauwen, Kooistra et al. 1995). Dès lors sécrété, il est activé par liaison de la fibrine et permet ainsi la transformation de plasminogène en plasmine qui dégrade la fibrine au niveau du caillot.

- L'exposition de sites de liaison pour le plasminogène et pour un récepteur au t-PA, produisant localement de la plasmine et favorisant la fibrinolyse (Cesarman-Maus and Hajjar 2005). Ce système est régulé par l'inhibiteur plasmatique du t-PA, appelé l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène type-1 (PAI-1), produit également par la cellule endothéliale (Gross and Aird 2000).

En conclusion, la cellule endothéliale joue un rôle majeur dans la régulation de l'hémostase en contrôlant la balance entre les facteurs pro- et anticoagulants, et en régulant la fibrinolyse, la vasoconstriction et la vasorelaxation. La contribution de chacun des facteurs dans cette balance varie selon le territoire vasculaire.

3. L'interaction avec les cellules sanguines circulantes

De part sa localisation à l'interface entre les éléments circulants du sang et les tissus sous-endothéliaux, la cellule endothéliale joue le rôle « d'intermédiaire » dans la localisation des cellules sanguines dans les tissus. Cette fonction est essentielle dans la réponse hémostatique et inflammatoire, et un défaut de régulation contribue à des complications thrombotiques et inflammatoires.

La cellule endothéliale exprime à sa surface des molécules adhésives permettant principalement trois types de fonctions :

- L'interaction des cellules endothéliales entre elles.
- L'interaction des cellules endothéliales avec les cellules sanguines circulantes.
- L'ancrage des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire et leur migration.

Les molécules impliquées dans les interactions des cellules endothéliales avec les cellules sanguines circulantes seront principalement documentées ici.

3.1. Les molécules d'adhésion endothéliales

Les molécules d'adhésion de surface, responsables des interactions des cellules endothéliales avec les cellules sanguines circulantes appartiennent à trois familles de protéines distinctes : les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines (Ig). Les sélectines, présentes à la surface endothéliale, initient la prise de contact avec les leucocytes. Ces derniers « roulent » le long du vaisseau sanguin, puis leurs intégrines lient des molécules endothéliales de la superfamille des Ig pour leur permettre l'arrêt, l'adhésion et enfin la transmigration de l'endothélium. Le déroulement de chacune de ces étapes sera détaillé au point 3.3 en page 51.

Les sélectines

Les sélectines sont impliquées dans l'interaction des cellules sanguines circulantes avec l'endothélium. Elles représentent une famille de trois glycoprotéines différentes ayant des motifs structuraux conservés (**figure 10**) : un domaine lectine calcium-dépendant au niveau N-terminal, suivi par un domaine type facteur de croissance épidermique (EGF), des domaines consensus répétés, un domaine transmembranaire et une petite partie intracytoplasmique (Cambien and Wagner 2004).

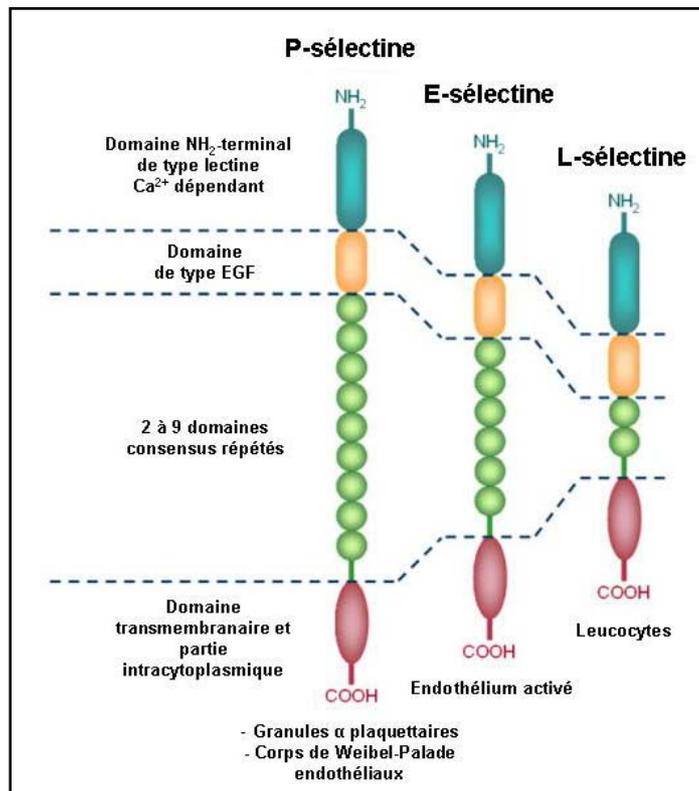


Figure 10: Schéma représentatif de la structure des molécules de la famille des sélectines.

La P-sélectine a une localisation plaquettaire et endothéliale, l'E-sélectine est exposée à la surface des cellules endothéliales activées et la L-sélectine est exprimée constitutivement par les leucocytes.

Cette famille est composée de : la L-sélectine (Leucocyte), la E-sélectine (Endothéliale) et la P-sélectine (Plaquettes) et leur expression cellulaire est particulière. La L-sélectine est présente sur les leucocytes et les lymphocytes (McEver, Moore et al. 1995). La P-sélectine est présente dans les granules α des plaquettes sanguines au repos et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales non-activées (Cambien and Wagner 2004). Elle est exposée à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales en réponse à différents agonistes (ADP, thrombine...). Enfin, la E-sélectine est absente des cellules endothéliales quiescentes, mais sa transcription est induite après une activation par des cytokines telles que le LPS et le TNF α (Collins, Read et al. 1995).

La surexpression ou le maintien prolongé de ces molécules à la surface cellulaire a des effets néfastes sur l'intégrité du système vasculaire. Il existe deux types de mécanismes régulant leur exposition à la surface cellulaire :

- Un mécanisme d'internalisation et de dégradation dans les lysosomes (P- et E-sélectines).
- Un clivage protéolytique par des protéases (de type calpaïne ou MMP), générant des formes solubles plasmatiques (L- et E-sélectines) (Leeuwenberg, Smeets et al. 1992; Hafezi-Moghadam, Thomas et al. 2001). Une forme soluble de P-sélectine a également été décrite chez l'Homme, résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm et produisant une forme dépourvue de domaine transmembranaire. Cependant, un clivage protéolytique de cette molécule n'est pas à exclure (Berger, Hartwell et al. 1998).

Les molécules de la superfamille des immunoglobulines

Les protéines appartenant à cette famille possèdent un motif structural similaire qui est un domaine extracellulaire de type Ig, répété un certain nombre de fois (**figure 11**). Ces domaines Ig permettent l'interaction, soit avec des molécules de la famille des Ig (interactions homotypiques), soit avec des protéines différentes comme les intégrines (interactions hétérotypiques). L'épissage alternatif est fréquent dans les ARN messagers codant pour ces protéines, produisant ainsi de nombreuses isoformes. Les molécules ICAM, VCAM-1 et PECAM-1 appartiennent à cette famille. Elles possèdent des fonctions de signalisation intracellulaire, qui ne seront pas abordées ici, et elles participent également à l'interaction entre cellules. Cette fonction est à présent détaillée.

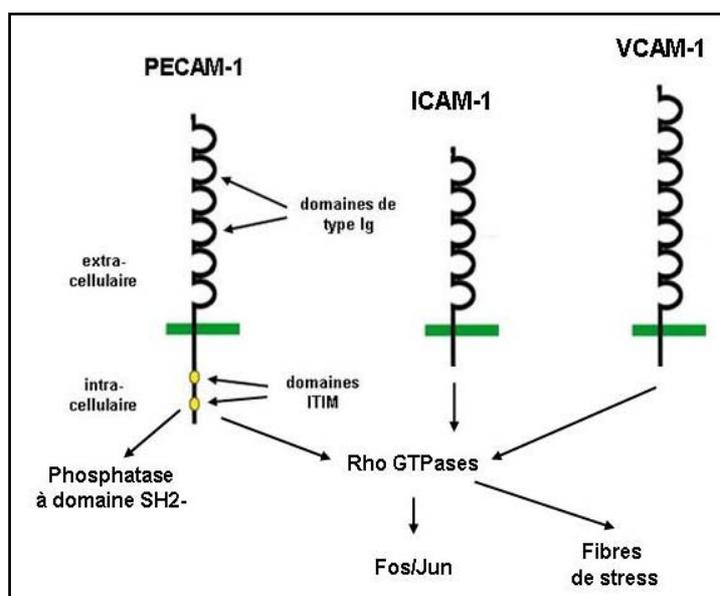


Figure 11: Schéma représentatif de la structure des molécules de la superfamille des immunoglobulines.

PECAM-1, ICAM-1 et VCAM-1 comme exemples. D'après et adapté de (Jackson 2003; Lebedeva, Dustin et al. 2005; Cernuda-Morollon and Ridley 2006).

Ces molécules sont composées, du côté extracellulaire, d'un domaine de type Ig répété un certain nombre de fois. Du côté intracellulaire, ces molécules contiennent des sites d'interaction avec des protéines pour permettre d'une part, la régulation de leur propre activité et d'autre part, de contrôler la transcription génique (*via*

via Fos/Jun), la formation de fibres de stress et de réguler d'autres voies de signalisation (*via* l'interaction de phosphatases à domaines SH2- avec les domaines ITIM pour PECAM-1).

Les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM) comprennent cinq membres mais seuls les trois premiers (ICAM-1, -2 et -3) ont une expression endothéliale (Hubbard and Rothlein 2000). ICAM-2 est exprimée de façon constitutive sur les leucocytes, les plaquettes sanguines et les cellules endothéliales. Au niveau endothélial, ICAM-2 joue un rôle important dans l'interaction des cellules endothéliales entre elles et son expression est insensible aux cytokines (de Fougerolles, Stacker et al. 1991; Diacovo, deFougerolles et al. 1994). ICAM-3 semble jouer un rôle majeur dans l'initiation de réponses immunitaires de part sa localisation sur des lymphocytes et les leucocytes (de Fougerolles and Springer 1992), mais elle a également été identifiée au niveau de vaisseaux sanguins situés dans des tumeurs de ganglions lymphatiques (Terol, Cid et al. 1996). ICAM-1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires à l'état basal et son expression peut être augmentée après une stimulation par des cytokines (IL-1, TNF α , LPS) au niveau des leucocytes et des cellules endothéliales (Hubbard and Rothlein 2000). A la surface endothéliale, la molécule ICAM-1 est impliquée dans l'interaction des cellules endothéliales avec les cellules sanguines circulantes et plus particulièrement, dans l'adhésion forte des leucocytes et leur transmigration. Elle interagit avec des intégrines (LFA-1 et Mac-1) exprimées par les leucocytes (Hubbard and Rothlein 2000; Kevil 2003), et son rôle dans le recrutement leucocytaire et la réponse inflammatoire a été démontré dans plusieurs études chez la souris (Broide, Humber et al. 1998; Hubbard and Rothlein 2000). *In vitro*, des études portant sur des cellules endothéliales immortalisées de souris déficientes en ICAM-1 ont montré que cette molécule est importante dans l'adhésion des monocytes et dans la transmigration de lymphocytes T (Reiss and Engelhardt 1999; Kevil, Patel et al. 2001). L'ensemble de ces données suggère que la molécule ICAM-1 participe aux mécanismes de l'inflammation et joue un rôle majeur dans l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales. En conclusion, les molécules ICAM ont pour fonction de participer activement aux mécanismes régulant les réponses inflammatoires et immunitaires (Hubbard and Rothlein 2000).

La molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1) est très faiblement exprimée à la surface des cellules endothéliales non activées, mais son expression est augmentée par différentes cytokines (TNF α et LPS). Elle est également présente sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes, les éosinophiles et les cellules dendritiques (Kevil 2003). Elle est impliquée dans l'adhésion des leucocytes à la surface endothéliale et leur transmigration *via* des interactions avec les intégrines leucocytaires $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$ (Kevil 2003). La délétion du gène codant pour cette molécule dans des souris s'est avérée être létale

démontrant un rôle important dans le développement du système vasculaire embryonnaire (Kwee, Burns et al. 1995). Des souris dépourvues du 4^e domaine de type Ig de la molécule VCAM-1 ont été générées afin de mimer des souris déficientes pour l'expression de cette molécule (Cybulsky, Iiyama et al. 2001). Dans un modèle de développement de plaques d'athérome, ces souris présentent une diminution de la taille des plaques ainsi qu'une adhésion réduite de monocytes à la surface de l'endothélium. Les auteurs de cette étude ont conclu que la molécule VCAM-1 joue un rôle majeur dans les phases initiales de la formation des plaques d'athérosclérose (Cybulsky, Iiyama et al. 2001).

La molécule d'adhésion cellulaire des plaquettes sanguines et des cellules endothéliales (PECAM-1) est présente sur les plaquettes, les cellules endothéliales, les monocytes et certains lymphocytes T et NK (Newman and Newman 2003). Au niveau endothélial, elle est exprimée constitutivement à plus d'un million d'exemplaires au niveau des jonctions basolatérales où elle permet le contact des cellules endothéliales entre elles. A ce niveau, elle participe aussi à la régulation de la transmigration des leucocytes et au maintien de l'intégrité et de la perméabilité de l'endothélium. Elle établit des interactions homophiliques (PECAM-1/PECAM-1) pour permettre le maintien des jonctions intercellulaires, nécessaires à la stabilisation des vaisseaux sanguins et à l'angiogenèse (DeLisser, Christofidou-Solomidou et al. 1997), et empêchant également l'apoptose des cellules endothéliales (Bird, Taylor et al. 1999).

3.2. Les interactions avec les plaquettes sanguines

Comme décrit plus haut, les plaquettes sanguines circulantes n'adhèrent pas à l'endothélium en l'absence d'activation de celui-ci. Ceci résulte de la sécrétion constitutive de NO et de PGI₂ par la cellule endothéliale, ainsi qu'à la présence de l'enzyme de dégradation des nucléotides, le CD39, à sa surface. Cependant, lors d'une lésion vasculaire où la monocouche de cellules endothéliales est dégradée, les plaquettes interagissent avec les protéines de la matrice sous-endothéliale, s'activent et contribuent à la formation de thrombine et du clou hémostatique. Les cellules endothéliales situées à proximité de la lésion vasculaire contribuent également à l'amplification de ces réponses par l'exposition de la molécule P-sélectine et la sécrétion de fvW. Ceci permet aux plaquettes sanguines circulantes de s'attacher au fvW, de s'activer au contact des agrégats plaquettaires formés et de sécréter des cytokines et des chimiokines afin de stimuler le recrutement de leucocytes et de favoriser la réparation du tissu lésé.

3.3. Les interactions avec les leucocytes

Durant l'inflammation, le recrutement des leucocytes au niveau sous-endothélial se déroule selon plusieurs étapes bien définies : 1- la formation initiale d'une liaison réversible entre les leucocytes et l'endothélium ; 2- le roulement puis l'activation des leucocytes attachés ; 3- le renforcement de la liaison par l'établissement de contacts intercellulaires résistants au flux sanguin ; 4- l'étalement des leucocytes sur l'endothélium et leur transmigration au niveau sous-endothélial (**figure 12**).

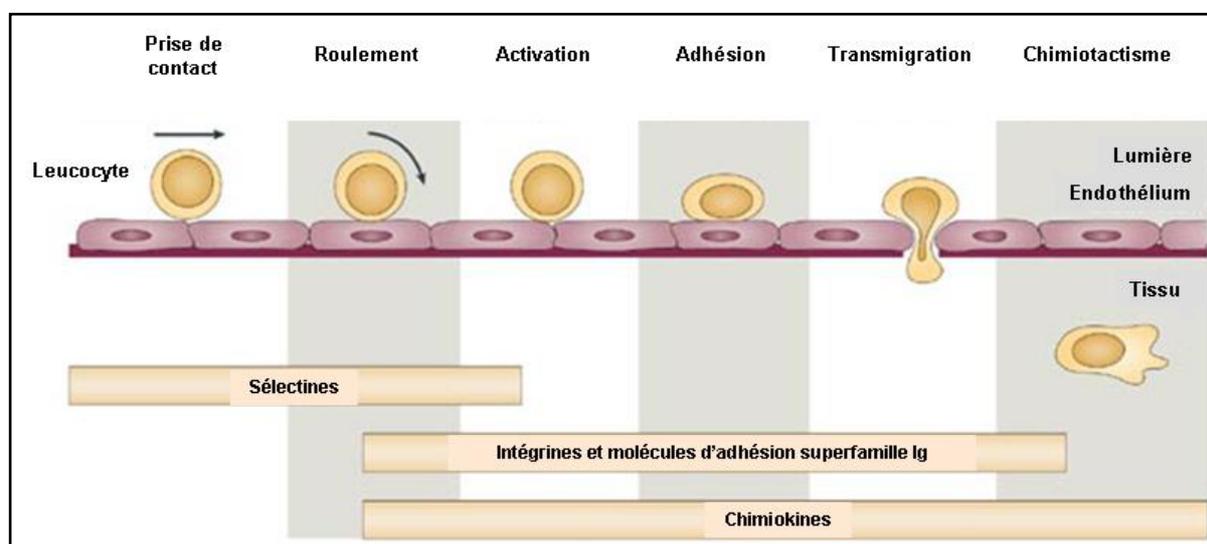


Figure 12: Schéma des différentes étapes gouvernant l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales et leur transmigration. D'après (Weber, Fraemohs et al. 2007).

La migration de leucocytes depuis le sang jusqu'au tissu inflammé résulte d'une succession de différentes étapes impliquant des signaux moléculaires et des molécules d'adhésion. Les sélectines (P- et E-) initient la prise de contact et le roulement des leucocytes le long de l'endothélium activé. Le roulement permet le ralentissement des leucocytes et leur interaction avec les cellules endothéliales. Des chimiokines, secrétées par les cellules endothéliales, activent les récepteurs aux chimiokines présents à la surface des leucocytes, qui permettent l'activation d'intégrines leucocytaires. L'interaction entre ces intégrines et les molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) exprimées à la surface endothéliale permet l'adhésion des leucocytes. Les leucocytes migrent selon des gradients de concentration de chimiokines le long et à travers de l'endothélium.

La **figure 13** illustre les différentes molécules impliquées dans cette interaction. Le stade initial des phases d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium comprend la margination et le roulement leucocytaire. La margination est le processus où les globules rouges, circulant au centre du vaisseau sanguin, dévient les leucocytes contre la paroi vasculaire, favorisant ainsi le contact entre les leucocytes et les cellules endothéliales. Ceci est également observé dans les bifurcations des gros vaisseaux où ce sont les turbulences du flux sanguin qui projettent les leucocytes contre la paroi. La liaison des leucocytes avec les cellules endothéliales est caractérisée, dans un premier temps, par des interactions cellule-cellule de faibles affinités (McEver 2001). Puis, le roulement des leucocytes est initié par les molécules endothéliales P- et la E-sélectines qui ont pour récepteurs les glycoprotéines ligands PSGL-1 et ESLG-1, présents à la surface des leucocytes (McEver, Moore et al. 1995; Ley 2003; Michiels 2003). Les leucocytes expriment également à leur surface la L-sélectine qui est aussi impliquée dans cette phase de roulement (Michiels 2003). Certains leucocytes comme les lymphocytes et les éosinophiles, utilisent les intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$ pour lier les molécules VCAM-1 endothéliales durant cette phase (Cines, Pollak et al. 1998). Ensuite, la formation d'interactions cellule-cellule de hautes affinités initie le début de la transmigration car elles permettent un bon ancrage des leucocytes à la surface endothéliale. Elles impliquent des intégrines leucocytaires comme Mac-1 et les molécules adhésives endothéliales ICAM-1 et VCAM-1. Enfin, la transmigration se poursuit *via* des interactions avec les molécules d'adhésion situées au niveau des jonctions inter-endothéliales dont les plus importantes sont PECAM-1, JAM (Junctional Adhesion Molecule) et CD99 (Engelhardt and Wolburg 2004). Depuis l'étape de roulement jusqu'à la localisation dans les tissus sous-endothéliaux, les leucocytes suivent des gradients de concentration de chimiokines secrétées par l'endothélium et les tissus inflammés (Weber, Fraemohs et al. 2007).

Il est intéressant de noter qu'il a été récemment identifié deux autres procédés par lesquels les leucocytes traversent l'endothélium (Dejana 2006). Dans les deux cas, les leucocytes n'empruntent pas la voie inter-endothéliale, mais ils migrent directement à travers les cellules endothéliales. Brièvement, le premier procédé consiste à l'émission, par les leucocytes, de pseudopodes dans des vésicules endothéliales formant un canal dans lequel s'infiltreront les leucocytes. Le deuxième procédé met en œuvre la phagocytose des leucocytes par les cellules endothéliales, puis leur « expulsion » du côté basal.

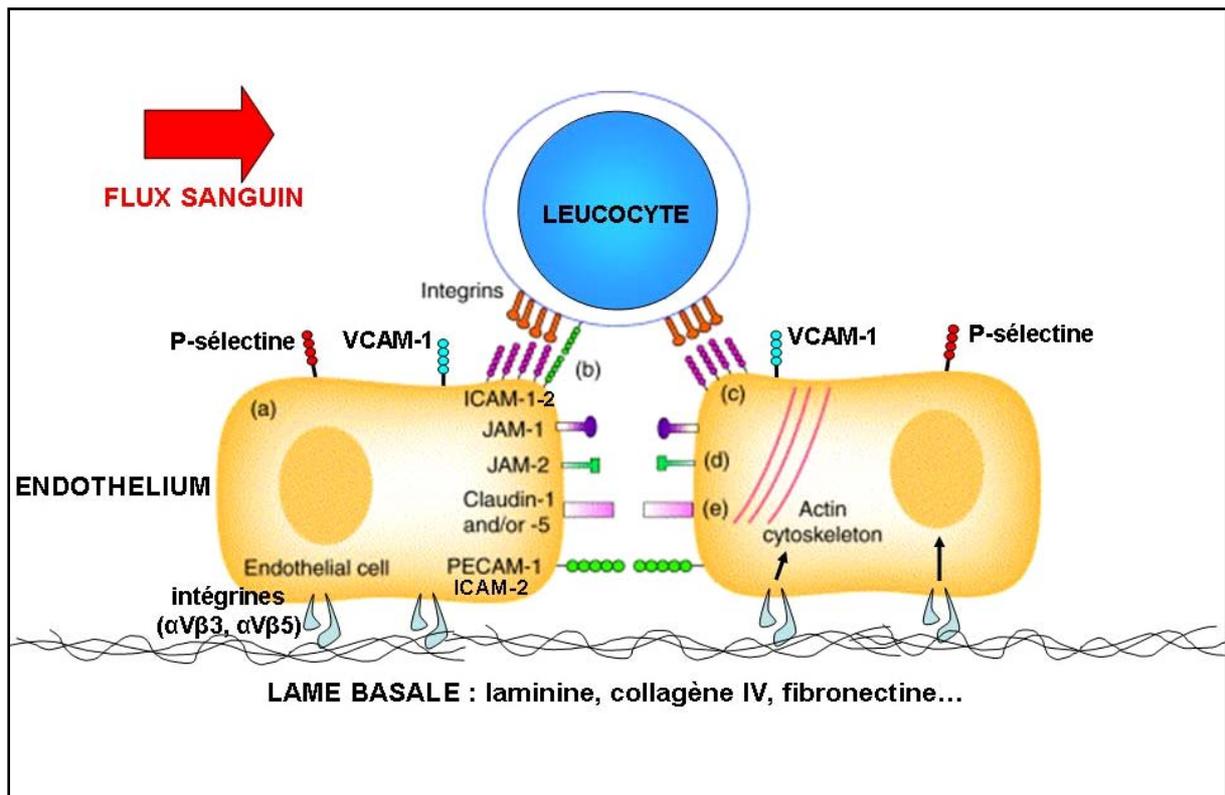


Figure 13: Schéma des molécules adhésives endothéliales permettant l'arrêt, l'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium.

Les molécules P-sélectine et VCAM-1 participent à la prise de contact, le roulement et l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium activé. Le contact entre les leucocytes et l'endothélium induit le "clustering" de la molécule ICAM-1, un ligand pour les intégrines leucocytaires. Ce contact est aussi responsable de la formation de fibres de stress dans la cellule endothéliale. Les jonctions serrées endothéliales contiennent les molécules JAM-1 et JAM-2. JAM-1 est impliquée dans la transmigration des monocytes et JAM-2 facilite plutôt le transport des lymphocytes. Les molécules de la famille des claudines constituent aussi les jonctions serrées endothéliales. Les intégrines endothéliales permettant l'ancrage des cellules endothéliales dans la lame basale sont également représentées. D'après (Imhof, Engelhardt et al. 2001).

4. Méthodes de culture et d'étude

Bien que l'isolement et la culture de cellules endothéliales permettent l'étude de fonctions spécifiques de ces cellules sans la présence d'autres types cellulaires, il apparaît que ces procédés introduisent des artefacts. En effet, la mise en culture des cellules endothéliales modifie leurs caractéristiques par rapport à celles existantes *in vivo*. Par exemple, leur taux de prolifération, dans des conditions de culture, est très supérieur à celui observé *in vivo* : d'un renouvellement de l'ordre du mois ou d'années pour des cellules *in vivo*, il est d'environ 16-24 heures *in vitro*. Hormis ces changements, tous les modèles d'étude nécessitant la culture de ces cellules ont permis d'accroître considérablement les connaissances acquises sur les fonctions et les mécanismes régulant les cellules endothéliales. Les études ont été effectuées soit à l'aide de cellules endothéliales primaires isolées d'organes dont les techniques sont abordées ci-dessous, soit à l'aide de lignées endothéliales transformées dont le principe sera détaillé en page 95. La culture de cellules endothéliales primaires requiert le respect d'une certaine méthodologie dans les étapes cruciales de l'isolement, de la croissance mais aussi de leur identification. La principale difficulté rencontrée concernant l'isolement de cellules endothéliales primaires est la contamination de la culture par d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, presque impossibles à éliminer.

4.1. L'isolement

Des cellules endothéliales peuvent être récoltées à partir d'un grand nombre de vaisseaux sanguins (aorte, veines saphène, ombilicale et pulmonaire, artères mammaire et pulmonaire et territoires microvasculaires d'organes) et provenant d'espèces différentes (Homme, bovin, rongeurs). Il existe plusieurs procédés permettant d'isoler les cellules endothéliales de leur organe :

- Par digestion enzymatique : utilisée notamment avec les gros vaisseaux pour l'isolement des HUVEC (Jaffe, Nachman et al. 1973). La collagénase et la DNase sont les deux enzymes permettant de libérer les cellules endothéliales de leur matrice sous-endothéliale par digestion des protéines de la membrane basale. Ce procédé permet d'obtenir des cellules en grande quantité mais de pureté moyenne. Cependant, le traitement enzymatique altère les protéines membranaires exprimées à la surface cellulaire ce qui peut gêner leur étude immédiate. Une deuxième sélection peut être effectuée, soit à l'aide de billes

magnétiques greffées sur des anticorps dirigés contre des protéines extracellulaires spécifiques des cellules endothéliales (Dong, Bernasconi et al. 1997; Marelli-Berg, Peek et al. 2000), soit par triage en cytométrie de flux (Huang, McIntosh et al. 2003) afin d'enrichir la population en cellules endothéliales.

- Par grattage mécanique de la lumière d'un vaisseau : utilisée dans notre laboratoire avec les artères mammaires et les veines saphènes humaines (Klein-Soyer, Beretz et al. 1986). Le vaisseau est coupé en deux sagittalement puis l'endothélium est gratté à l'aide d'un scalpel pour détacher les cellules endothéliales du vaisseau. Ceci peut être complété par une perfusion d'une solution contenant des billes afin de faciliter le décollement des cellules endothéliales (Schelling, Meininger et al. 1988). Le rendement est très faible mais la pureté de la culture est satisfaisante.

4.2. *La culture*

L'expansion des cellules endothéliales récoltées nécessite de respecter certaines consignes :

- Ensemencer les cellules dans des boîtes de culture en plastique dans lesquelles de la gélatine ou de la fibronectine est préalablement adsorbée afin d'augmenter la survie des cellules et de favoriser leur migration.

- Utiliser un milieu de culture spécifique pour les cellules endothéliales (microvasculaires, par exemple), supplémenté de 15 à 20 % de sérum de veau fœtal ou humain décomplémenté. L'ajout d'héparine est fortement conseillé dans la mesure où elle permet de prolonger l'activité mitogénique de facteurs de croissance contenus dans le sérum (Gospodarowicz and Cheng 1986). L'ajout d'un extrait de glande pituitaire de cerveau bovin (ECGS), très riche en facteurs de croissance, stimule également la prolifération endothéliale (Maciag, Kadish et al. 1982).

- Les cellules ne doivent pas être ensemencées trop diluées : pour cela, on respecte une dilution de 1/2 ou 1/3 du contenu d'une boîte de culture à confluence.

4.3. L'identification

Différents critères permettent de caractériser des cellules endothéliales en culture :

- Des critères morphologiques : à confluence, elles forment une monocouche avec un aspect de pavés de trottoir (**figure 14**) lors de leur observation au microscope. Contrairement à la situation *in vivo*, leur état confluent ne subsiste que deux ou trois jours maximum ; au-delà, la monocouche se désorganise et les cellules entrent en apoptose. Elles possèdent aussi la capacité de modifier leur apparence selon le flux. En effet, lors de la perfusion d'une solution à la surface des cellules cultivées, celles-ci s'allongent dans la direction du flux, comme dans un vaisseau sanguin *in vivo* (Stevens, Rosenberg et al. 2001). Une autre caractéristique morphologique est leur capacité à former des tubes après leur ensemencement sur du Matrigel, de la fibrine ou du collagène (Wilasrusmee, Da Silva et al. 2002).

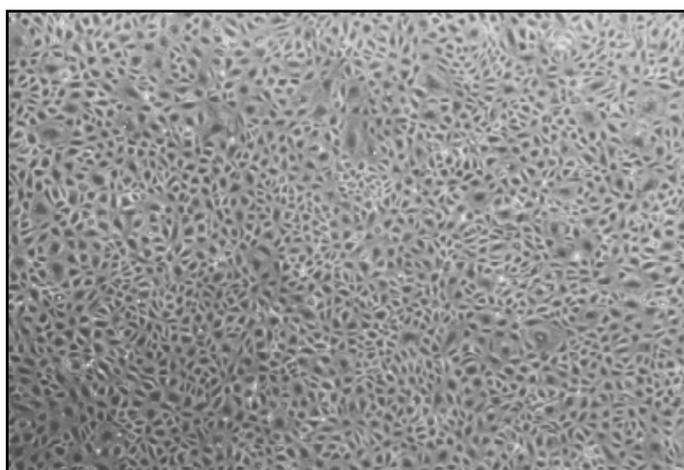


Figure 14: Photographie de cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain en culture (HUVEC).

A confluence, les cellules endothéliales en culture présentent la caractéristique d'avoir un aspect pavimenteux, sans superposition de cellules.

- Des critères métaboliques : certains de ces critères sont spécifiques à la cellule endothéliale alors que d'autres le sont moins, mais ils apportent un élément en faveur de leur identification. La cellule endothéliale possède l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) en angiotensine II, un peptide vasoconstricteur. Cette enzyme peut être détectée par immunocytochimie sur des cellules en culture et fixées, mais aussi par la mesure de la formation d'un produit de réaction chromogène. Elle possède également à sa surface des

récepteurs aux LDL et leur présence est révélée par une incubation de 4h en présence de LDL acétylés et couplés à un fluorochrome. La formation de PGI₂ dans les surnageants des cellules en culture peut être appréciée par dosages Elisa et l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) par RT-PCR, immunocytochimie, Western blot ou par le dosage colorimétrique de NO dans le surnageant.

- Des marqueurs cellulaires : différents marqueurs cellulaires sont localisés soit dans le cytoplasme soit à la surface membranaire de la cellule endothéliale et ils peuvent être mis en évidence par cytométrie de flux ou par immunocytochimie. Le facteur de von Willebrand est stocké dans les corps de Weibel-Palade mais aussi dans le cytoplasme (van Mourik, Romani de Wit et al. 2002) et sa détection s'effectue par immunocytochimie sur des cellules en culture, fixées et perméabilisées. L'identification des molécules de surface endothéliales telles que PECAM-1, ICAM-2, ICAM-1, VCAM-1, VE-cadhérine et la P-sélectine est réalisée par des expériences de cytométrie de flux ou par réactions immunocytochimiques. Certaines lectines peuvent aussi être utilisées pour identifier les cellules endothéliales humaines (*Ulex europeus lectine type I*) et celles d'autres espèces (isolectine B₄) ; elles reconnaissent des motifs sucrés type galactose ou fucose à la surface membranaire (Laitinen 1987).

BUT DE CE TRAVAIL

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle des récepteurs P2 des nucléotides dans l'angiogenèse. Pour cela, nous avons d'abord mis au point un modèle d'étude *in vivo* chez la souris. Nous avons également été amenés à établir des lignées immortalisées de cellules endothéliales de souris.

Parmi les récepteurs P2Y exprimés dans les cellules vasculaires, les récepteurs P2Y₁ et P2Y₄ sont présents dans de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les leucocytes et les plaquettes sanguines. Le récepteur P2Y₁₂ a une expression restreinte dans les plaquettes sanguines où il joue un rôle important dans l'activation plaquettaire, tout comme le récepteur P2Y₁. L'ensemble de ces cellules participent à l'angiogenèse et nous avons voulu savoir quelle était la part de chacun de ces trois récepteurs dans ce processus.

Nous avons utilisé des souris déficientes pour l'expression des récepteurs P2Y₁ et P2Y₄ dans lesquelles le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel a été appliqué. Pour l'étude du rôle du récepteur P2Y₁₂ dans ce modèle, le laboratoire ne disposant pas des souris KO pour ce récepteur, nous avons traité des souris normales au clopidogrel, une thiéno-pyridine antiagrégante, qui permet d'inhiber sélectivement ce récepteur. Enfin, nous avons appliqué la technique d'immortalisation de cellules endothéliales à des souris normales et nous les avons caractérisées. Ces cellules endothéliales ont ensuite été comparées à celles issues de souris déficientes pour l'expression du récepteur P2Y₁ pour étudier le rôle de ce récepteur dans ces cellules.

II- RESULTATS

A. Mise au point du modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel chez la souris

1. Introduction

La description de ce modèle a été publiée pour la première fois en 1992 par l'équipe de Passaniti (Passaniti, Taylor et al. 1992). Le Matrigel est une solution visqueuse qui résulte du mélange de milieu de culture classique DMEM avec un cocktail de plusieurs protéines de la membrane basale. Ces protéines sont la laminine, le collagène IV, l'entactine, des héparans sulfates, des facteurs de croissance et des MMP, qui sont extraites d'un sarcome de souris (BD Biosciences). Le Matrigel possède la caractéristique d'être liquide à +4°C et de se gélifier à température corporelle (+37°C). Il est injecté en sous-cutanée au niveau de la ligne médiane, du côté abdominal de la souris anesthésiée, puis il est prélevé généralement 7 ou 14 jours plus tard. Après sa dissection, de larges vaisseaux en périphérie du gel sont observés, alors que ceux au centre sont plus petits ((Passaniti, Taylor et al. 1992) et observations personnelles). Les critères d'étude de la réponse angiogénique sont le dosage de l'hémoglobine contenue dans le gel, la quantification du nombre de vaisseaux néoformés et l'envahissement cellulaire du gel.

Le travail de Passaniti a permis de démontrer que, lors de l'ajout d'un cocktail contenant du FGF-2 et de l'héparine, la réponse angiogénique obtenue après 7 jours est caractérisée par de larges vaisseaux sanguins fonctionnels et une migration cellulaire importante dans le gel (Passaniti, Taylor et al. 1992). La formation de vaisseaux sanguins est constatée après 2 jours, puis elle est croissante jusqu'au 8^e jour où elle atteint un plateau. La quantité d'hémoglobine contenue dans le gel est corrélée avec le nombre de vaisseaux positifs pour le fvW et le gel est progressivement envahi de cellules. Enfin, il a démontré que ce modèle est sensible à l'ajout d'un composé antiangiogénique.

Ce modèle d'angiogenèse possède les avantages d'être reproductible, sensible et de permettre l'étude quantitative et qualitative de l'effet de composés angiogéniques ou antiangiogéniques. De plus, il permet la possibilité, après dissolution du gel, de récupérer les cellules afin de les cultiver et de les analyser. Cependant, c'est un modèle onéreux et il requiert de nombreuses techniques histologiques pour l'analyse des différents paramètres de la réponse angiogénique.

Dans un premier temps, ce modèle a été testé et mis au point sur des souris normales C57BL/6. Les conditions expérimentales utilisées sont celles de l'étude qui a démontré que l'absence de l'ectoenzyme CD39 perturbe la migration de cellules dans le gel et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Goepfert, Sundberg et al. 2001).

2. Matériels et méthodes

Matériel

Le Matrigel et le Matrisperse proviennent de BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France). Le VEGF, le FGF-2, la BSA Fatty Acid Free (FAF), la sphingosine 1-phosphate (S1P), le kit Drabkin, l'IgG_{2a} de souris, l'eau oxygénée H₂O₂ et la trypsine proviennent de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). La kétamine (Imalgène 1000[®]) provient de Bayer (Puteaux, France) et la xylazine (Rompun[®]) de Merial (Lyon, France). Le paraformaldéhyde, l'éthanol, la paraffine sont fournis par Merck Eurolab (Strasbourg, France). Le Triton X-100 provient de Merck (Darmstadt, Allemagne). Les solvants et les lames de microscope proviennent de CML (Nemours, France). L'hématoxyline de Harris et l'éosine sont fournies par Labonord (Templemars, France). Le sérum normal, l'anticorps biotinylé, la peroxydase et le kit Novared proviennent de chez Coger (Paris, France). L'anticorps anti-PECAM-1 de souris est fourni par BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France), l'anticorps anti-F4/80 de souris, l'anticorps anti-neutrophile de souris et l'anticorps anti- α -actine des cellules musculaires lisses humaines proviennent d'Argène (Varilhes, France), les anticorps isotypiques IgG_{2a} et IgG_{2b} de rat et la solution fixatrice de zinc sont fournis par BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France).

Les souris

Les souris contrôles C57BL/6 sont fournies par Iffa-Credo (L'Abresles, France).

Protocole expérimental d'injection de Matrigel

Le Matrigel est rendu liquide par conservation à +4°C durant une nuit. Des facteurs angiogéniques (1,4 μ g/mL VEGF, 8 μ g/mL FGF-2 et 500 nM S1P) et de l'albumine bovine (BSA Fatty Acid Free, 116 μ g/mL) sont ajoutés stérilement et extemporanément au Matrigel. Ces facteurs ainsi que leurs concentrations ont été choisis car ils permettent d'obtenir une réponse angiogénique importante dans le modèle de Matrigel chez la souris (Passaniti, Taylor et al. 1992; Lee, Kim et al. 1999; Goepfert, Sundberg et al. 2001). De plus, ce cocktail de

facteurs a permis de mettre en évidence l'implication de l'ectoenzyme CD39 dans la réponse angiogénique dans ce modèle (Goepfert, Sundberg et al. 2001). Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de 100 µL/10 g de souris, d'un mélange de xylazine base 0,2% et de kétamine 1% diluées dans du NaCl 0,9%. Le Matrigel (400 µL) est injecté à des souris âgées de 6-8 semaines, en sous-cutanée au niveau de la ligne médiane abdominale (**figure 15A**). Il est prélevé 7 et/ou 14 jours après injection, rincé dans du PBS et fixé au paraformaldéhyde (PFA) 4% durant une nuit à +4°C ou dans une solution de zinc pendant 3 jours. Cette solution permet de préserver au mieux l'antigénicité des molécules durant la fixation (Garaud and Roussel).

Examen histologique du Matrigel

Après fixation, le Matrigel est déshydraté par des bains successifs d'éthanol et de solvant puis imprégné et inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome, montées sur lames et colorées en hématoxyline-éosine (HE) selon la méthode standard (Silverton and Anderson 1961) (**figure 15B**). Les lames sont ensuite montées d'une lamelle puis séchées à l'air libre.

Quantification de la cellularité du Matrigel

La coloration en HE des coupes de Matrigel permet premièrement, la localisation des cellules ayant migré dans le gel et deuxièmement, le calcul de l'aire totale occupée par celles-ci. La quantification de cette aire est réalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Metamorph, Universal Imaging Corp., West Chester, Etats-Unis) qui permet l'étude d'images acquises par une camera noir et blanc (Roper Scientific, Tucson, Etats-Unis), montée sur un microscope inversé (Leica DMR, Leica Microsystems SA, Wetzlar, Allemagne). Le logiciel permet de définir dans le gel, un champ d'étude d'une dimension bien définie en pixel, puis l'image obtenue est digitalisée afin de quantifier, en pixel, l'aire totale occupée par les cellules (**figure 15B**). La cellularité dans un champ d'étude est calculée de la façon suivante :

$$\text{Cellularité (\%)} = (\text{aire des cellules colorées} / \text{aire du champ d'étude}) \times 100.$$

L'analyse est effectuée en parcourant l'intégralité du Matrigel du côté abdominal et au centre de celui-ci. Sept à vingt champs différents sont nécessaires pour parcourir l'ensemble du gel. Pour une coupe donnée de Matrigel, une moyenne de la cellularité de tous les champs d'étude est calculée. Ensuite, la cellularité moyenne du Matrigel étudié est déterminée en

calculant la moyenne des valeurs obtenues à partir d'au moins trois coupes différentes réparties sur la totalité du Matrigel.

Identification immunohistochimique des cellules présentes dans le Matrigel

Les coupes de Matrigel sont déparaffinées, hydratées puis incubées avec de l'eau oxygénée H₂O₂ 1% afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Elles sont ensuite perméabilisées par du PBS-Triton 1% et incubées avec 1,5% de sérum de lapin ou de cheval contenant de la BSA Fatty Acid Free afin de saturer les sites non spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées en présence du premier anticorps, puis après lavages, l'anticorps secondaire anti-espèce biotinylé est ajouté (dilution au 1/200^e). L'addition du complexe Avidine-Biotine-Péroxydase, suivie du substrat de l'enzyme (kit Novared), permet la coloration du marquage. Enfin, les coupes sont colorées en HE, puis déshydratées et montées d'une lamelle à l'aide d'une solution de montage aqueuse. Un contrôle est réalisé à l'aide d'un anticorps non-immun, de même espèce et d'isotype que l'anticorps primaire.

Les cellules endothéliales sont identifiées par la présence de PECAM-1 en incubant les coupes durant une nuit, à +4°C, avec un anticorps IgG_{2a} monoclonal de rat dirigé contre la PECAM-1 de souris (concentration finale : 2 µg/mL).

Les macrophages sont identifiés par la présence de F4/80 à leur surface. F4/80 est identifié comme une sous-population de récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) spécifique des macrophages murins (Stacey, Lin et al. 2001). Les coupes sont incubées 2h à température ambiante avec un anticorps IgG_{2b} monoclonal de rat dirigé contre le F4/80 de souris (concentration finale : 20 µg/mL). L'utilisation de cet anticorps nécessite un traitement au préalable des coupes par une solution de trypsine 0,1%, afin de démasquer les sites antigéniques.

Les polynucléaires neutrophiles sont identifiés par la présence d'un antigène spécifique de ces cellules (antigène polymorphe de 40 kD (Hirsch and Gordon 1983)). Les coupes sont incubées durant une nuit, à +4°C, avec un anticorps IgG_{2a} monoclonal de rat dirigé contre l'antigène de souris (concentration finale : 20 µg/mL).

Les cellules musculaires lisses sont identifiées par la présence de l' α -actine spécifique des cellules musculaires lisses et des cellules myoépithéliales. Les coupes sont incubées 1h à température ambiante avec un anticorps IgG_{2a} monoclonal de souris dirigé contre l' α -actine des cellules musculaires lisses humaines (concentration finale : 33 µg/mL). Cet anticorps reconnaît également l' α -actine des souris et il nécessite au préalable, un démasquage des sites

antigéniques par un traitement des coupes aux micro-ondes en présence d'un tampon citrate 10 mM, pH 6,0.

Quantification de l'hémoglobine contenue dans le Matrigel

Après prélèvement, le Matrigel est pesé, rincé dans du PBS puis coupé en petits morceaux à l'aide de ciseaux. Il est ensuite incubé, sous agitation pendant une nuit à +4°C, en présence de Matrisperse, une solution qui permet la dépolymérisation du Matrigel et la libération des cellules et des globules rouges contenus dans le gel (Rana, Mischoulon et al. 1994). La quantité d'hémoglobine est ensuite mesurée à l'aide d'un kit et selon la méthode de Drabkin : en présence de la solution de Drabkin, l'hémoglobine contenue dans le Matrigel est oxydée en méthémoglobine puis transformée en cyanmethémoglobine qui absorbe à 545 nm (Lambertsen, Bunce et al. 1952). La quantité d'hémoglobine par mg de Matrigel est calculée à l'aide d'une courbe de calibration obtenue à partir d'un échantillon de sang de souris.

Quantification des vaisseaux sanguins néoformés dans le Matrigel

Après marquage immunohistochimique des cellules endothéliales à l'aide de l'anticorps dirigé contre la molécule PECAM-1, les vaisseaux ainsi identifiés sont dénombrés au microscope optique. Les résultats sont exprimés en nombre total de vaisseaux marqués par champs d'étude.

Statistiques

Les résultats représentent la moyenne \pm SEM obtenue à partir d'au moins trois souris. Les résultats ont été analysés en utilisant le test t de Student afin de pouvoir comparer statistiquement les moyennes de deux groupes. Les différences ont été jugées significatives quand la valeur de P est inférieure à 0,05.

3. Résultats

Suite à son injection sous-cutanée, le Matrigel se gélifie et se distingue facilement des tissus environnants (**figure 15A**). La **figure 15B** représente, après la dissection et la coloration en HE des coupes, la localisation du gel en sous-cutanée avec, d'un côté les tissus de la peau et de l'autre, les muscles squelettiques de la paroi abdominale. L'image en noir et blanc de droite, est une digitalisation d'un champ d'étude donné pour la quantification de la cellularité du gel (**figure 15B**).

3.1. Etude cinétique de la cellularité du Matrigel

La cinétique réalisée chez les souris contrôles C57BL/6 montre qu'après 3 jours, l'envahissement cellulaire du Matrigel s'observe du côté abdominal et qu'il représente $6,8 \% \pm 1,3$ (n=6) de la totalité du gel (**figure 16**). Après 7 jours, la cellularité est plus importante ($12,4 \% \pm 0,6$; n=6) mais pas différente de celle observée après 14 jours ($12,1 \% \pm 0,2$; n=6). De nombreux vaisseaux fonctionnels sont présents dans le gel, caractérisés par la présence de globules rouges dans leur lumière. A 21 jours, le Matrigel a un aspect fragmenté et seules quelques rares cellules sont encore présentes.

3.2. Dosage de l'hémoglobine

Le dosage de l'hémoglobine contenue dans le gel permet d'avoir une indication du nombre de vaisseaux fonctionnels qui se sont formés durant la réponse angiogénique. La quantification réalisée à 7 et 14 jours après l'implantation démontre que le contenu en hémoglobine est identique ($0,19$ mg hémoglobine/mg Matrigel $\pm 0,03$ à J7 (n=5) et $0,19$ mg hémoglobine/mg Matrigel $\pm 0,04$ à J14 (n=6)) (**figure 16E**).

L'ensemble de ces données démontre que le cocktail de facteurs de croissance utilisé dans ce modèle induit une réponse angiogénique maximale au 7^e jour et qui est stable jusqu'au 14^e jour. Cette observation est en accord avec le travail de l'équipe de Passaniti où l'utilisation de différents facteurs de croissance, dans ce modèle, générerait une cellularité et un contenu en hémoglobine maximums au 8^e jour (Passaniti, Taylor et al. 1992).

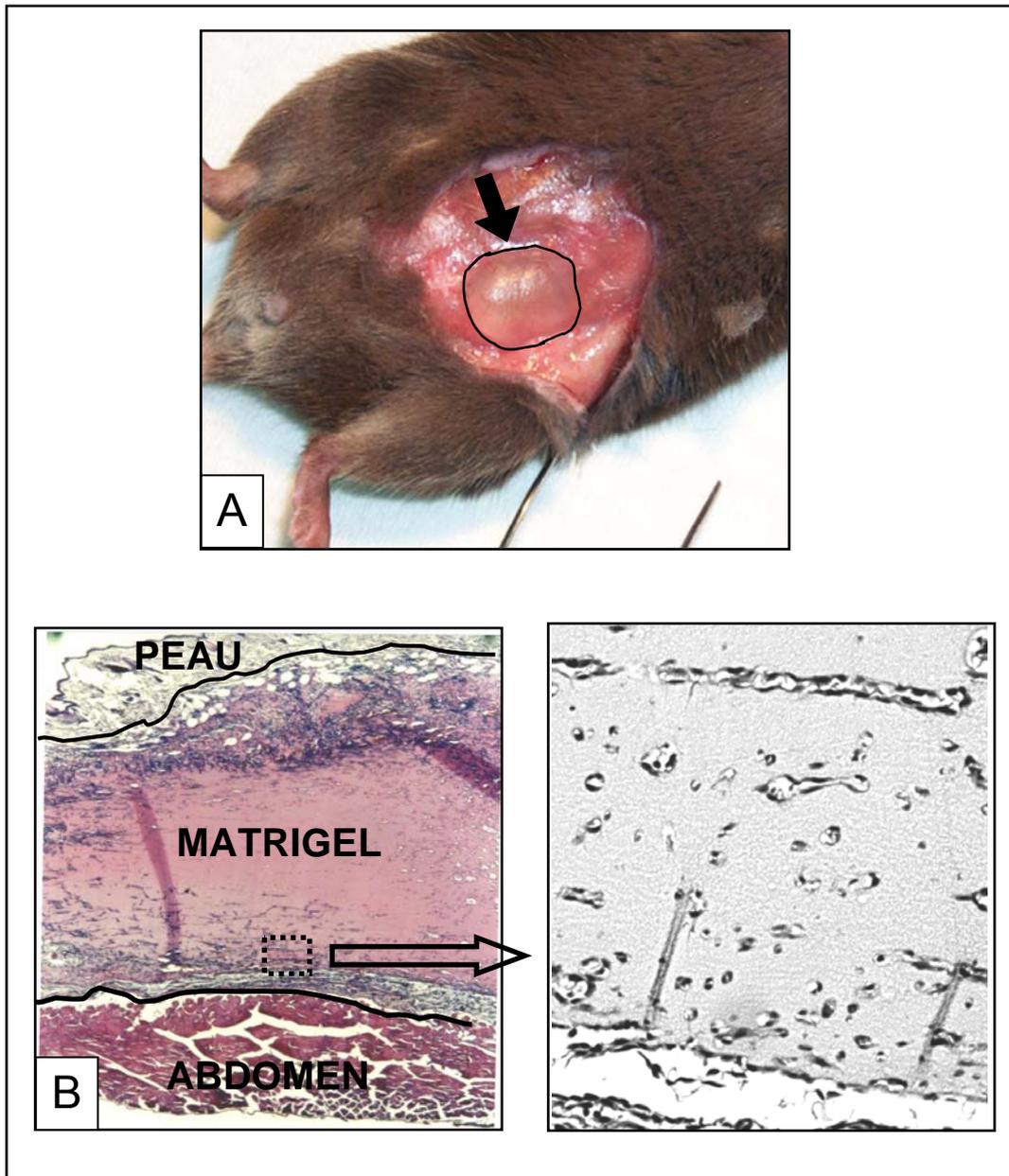


Figure 15: Aspect du Matrigel après injection chez la souris et quantification de la cellularité.

A: Vue d'ensemble du Matrigel après l'injection en sous-cutanée chez la souris. Après l'injection, le Matrigel se gélifie et reste bien individualisé dans le corps de la souris.

B: Méthode de mesure de la cellularité du Matrigel.

Après la coloration en hématoxyline-éosine d'une coupe de Matrigel, le logiciel Metamorph permet de calculer l'aire représentée par les noyaux cellulaires présents dans un champ d'étude donné (cf. l'encadré à droite). Cette aire est ensuite comparée à l'aire totale du champ d'étude.

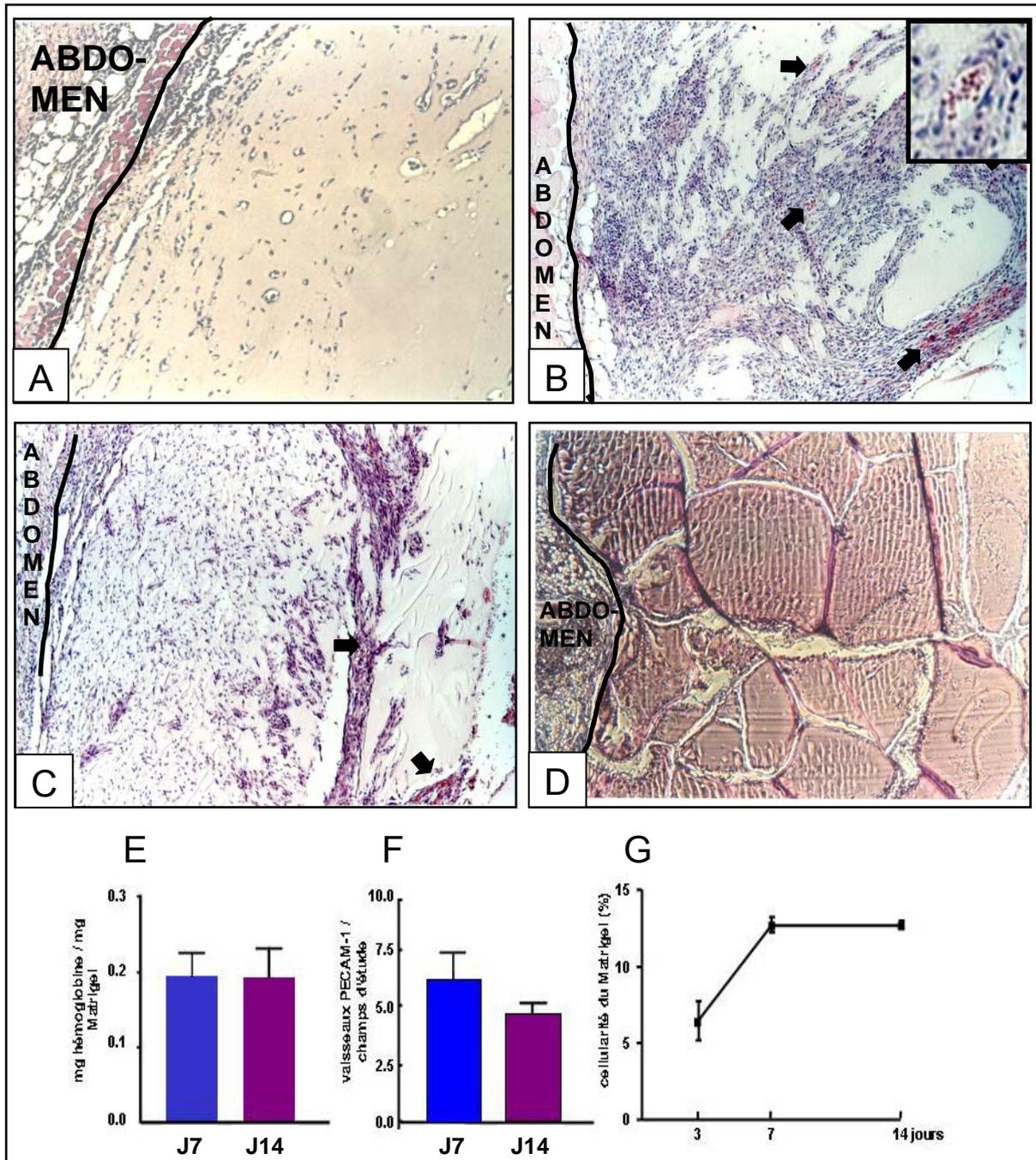


Figure 16: Cinétique de la réponse angiogénique dans le Matrigel chez la souris normale.

A-B-C-D: Colorations en HE de coupes de Matrigel, côté abdominal, prélevés au 3^e (A), 7^e (B), 14^e (C) et 21^e jours (D) (grossissement x10). Après 3 jours, les cellules envahissent le Matrigel depuis le côté abdominal (A) et au 7^e jour, elles occupent une grande partie du gel (B); la présence de vaisseaux fonctionnels est observée (flèches pleines et encadré). A 14 jours, la cellularité est toujours importante mais on dénombre moins de vaisseaux (C). Après 21 jours, le gel est fragmenté et dépourvu de cellules (D).

E: Contenu en hémoglobine du Matrigel après 7 et 14 jours. Il n'y a pas de différence significative dans le contenu en hémoglobine des gels (n=6).

F: Quantification du nombre de vaisseaux positifs pour la molécule PECAM-1, après 7 et 14 jours (n=6).

G: Quantification de la cellularité totale des gels à 3, 7 et 14 jours (n=6).

La réponse angiogénique obtenue est maximale aux 7^e et 14^e jours.

3.3. Identification des cellules

Dans le but d'identifier les cellules ayant migré dans le Matrigel, des études immunohistochimiques ont été réalisées, sur des coupes de gels prélevés après 7 jours, à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses, de macrophages et de polynucléaires neutrophiles. Ces cellules jouent un rôle majeur dans les différentes étapes de l'angiogenèse et leur implication a été démontrée dans ce modèle (Polverini 1997; Conway, Collen et al. 2001; Benelli, Morini et al. 2002). La présence de vaisseaux fonctionnels observés après 7 et 14 jours (**figures 16B et C**) est confirmée ici par l'immunomarquage PECAM-1 de cellules endothéliales bordant la lumière des vaisseaux (**figure 17A**, flèches pleines). Ce marquage a permis de compter les vaisseaux positifs obtenus. Aux 7^e et 14^e jours, $6,4 \pm 1,1$ vaisseaux et $4,9 \pm 0,3$ vaisseaux positifs sont dénombrés, respectivement (n=6) (**figure 16F**). Ces vaisseaux sont accompagnés de cellules musculaires lisses qui sont identifiées par l' α -actine des cellules musculaires lisses (**figure 17B**) et localisées tout autour et à proximité des vaisseaux fonctionnels. La présence de cellules endothéliales isolées et non organisées en vaisseaux est aussi observée (**figure 17A**, flèches vides). Après 7 jours, le gel est également colonisé par des cellules de l'inflammation telles que les macrophages (**figure 17C**) et les polynucléaires neutrophiles (**figure 17D**).

L'ensemble de ces observations confirme la forte réponse angiogénique induite par les facteurs de croissance dans le Matrigel. Cette réponse est caractérisée par la présence de cellules endothéliales essentiellement organisées en vaisseaux fonctionnels, ces derniers étant stabilisés par des cellules musculaires lisses. De plus, l'observation de nombreuses cellules de l'inflammation suggère que ce modèle engendre une réponse inflammatoire chez la souris.

3.4. Modulation de la réponse angiogénique

L'ajout d'un cocktail de facteurs de croissance (VEGF, FGF-2 et S1P) dans le Matrigel est responsable d'une réponse angiogénique importante selon les données obtenues ci-dessus. Dans le but d'appliquer ces conditions expérimentales à des souris génétiquement modifiées ou traitées pharmacologiquement afin d'étudier les mécanismes de l'angiogenèse, il est nécessaire d'évaluer, au préalable, la sensibilité de ce modèle. C'est pourquoi, un composé ayant des propriétés antiangiogéniques, a été ajouté, en plus du cocktail de facteurs angiogéniques, et l'effet inhibiteur sur la réponse angiogénique a été apprécié. Le critère d'étude a été le comptage, au 7^e jour, des vaisseaux fonctionnels positifs pour la molécule

PECAM-1. L'angiostatine a été choisie pour ses propriétés antiangiogéniques démontrées chez la souris, dans un modèle d'angiogenèse tumorale (O'Reilly, Holmgren et al. 1994) et surtout, dans le modèle par injection de Matrigel en présence de LPS (Benelli, Morini et al. 2002). Dans cette dernière étude, la réponse angiogénique obtenue après 5 jours est réduite en présence d'angiostatine (2,5 µg/mL). L'angiostatine est issue de la dégradation protéolytique du plasminogène et son mécanisme inhibiteur de l'angiogenèse n'est pas totalement élucidé ; il semble mettre en jeu une inhibition de l'ATP synthase membranaire des cellules endothéliales suivie de leur apoptose (Moser, Stack et al. 1999). L'ajout d'angiostatine dans le gel, en présence du cocktail de facteurs angiogéniques, est responsable d'une diminution du nombre de vaisseaux positifs pour la molécule PECAM-1 obtenus après 7 jours ($6,3 \pm 0,2$ contre $10,2 \pm 0,4$ sans angiostatine ; $n=4$; $P=0,012$) (**figure 18**). Aucune différence n'a été observée pour la cellularité et le contenu des gels en macrophages, neutrophiles et cellules musculaires lisses (non montré).

En conclusion, le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel chez la souris induit une réponse angiogénique importante lors de l'ajout d'un cocktail de facteurs de croissance composé du VEGF, du FGF-2 et de la sphingosine 1-phosphate. Cette réponse peut être modulée par l'ajout d'un composé antiangiogénique (l'angiostatine) confirmant ainsi la sensibilité de ce modèle (Passaniti, Taylor et al. 1992). L'analyse de la cinétique de la réponse angiogénique montre que l'envahissement cellulaire et la formation de vaisseaux sanguins dans le Matrigel sont maximums aux 7^e et 14^e jours après l'implantation du gel. Outre la migration de cellules endothéliales dans le gel et leur organisation en vaisseaux sanguins renforcés par la présence de cellules musculaires lisses, ce modèle est également caractérisé par le recrutement de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les neutrophiles. Ainsi, la réponse angiogénique obtenue dans ce modèle est la résultante d'une coopération entre différents types de cellules spécialisées, illustrant la complexité des mécanismes mis en jeu dans ce processus. L'ensemble de ces observations suggère que ce modèle représente un outil pour l'étude du rôle des récepteurs P2Y dans la réponse angiogénique chez la souris.

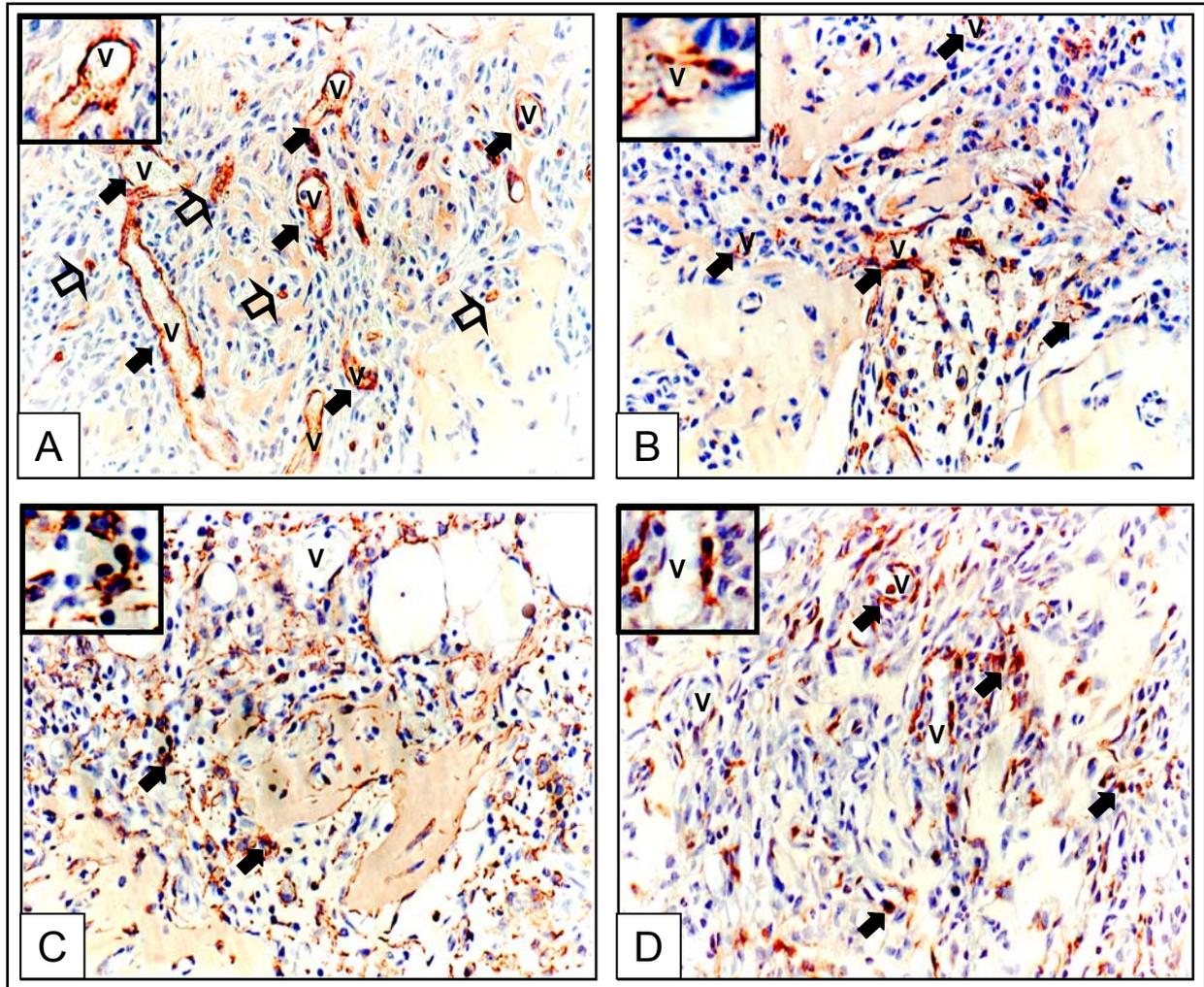


Figure 17: Immunomarquage des cellules contenues dans le Matrigel après 7 jours chez la souris normale.

A : Cellules endothéliales identifiées par la molécule PECAM-1 ; elles bordent des vaisseaux fonctionnels (V) et on note la présence de cellules endothéliales isolées (flèches vides). **B :** Cellules musculaires lisses identifiées par l' α -actine des cellules musculaires lisses ; elles sont situées à proximité et autour de vaisseaux. **C :** Macrophages identifiés par la molécule F4/80. **D :** Neutrophiles identifiés par l'antigène polymorphe de 40 kD. Les cellules sont indiquées par des flèches pleines et le marquage spécifique des cellules est brun (coloration Novared). Ces 4 coupes sont espacées les unes des autres de 5 μ m et se succèdent dans l'ordre suivant : C, D, B puis A ; grossissement x40. Les encadrés représentent des agrandissements des différents marquages. La réponse angiogénique obtenue est caractérisée par la présence de cellules organisées en vaisseaux sanguins et par des cellules de l'inflammation.

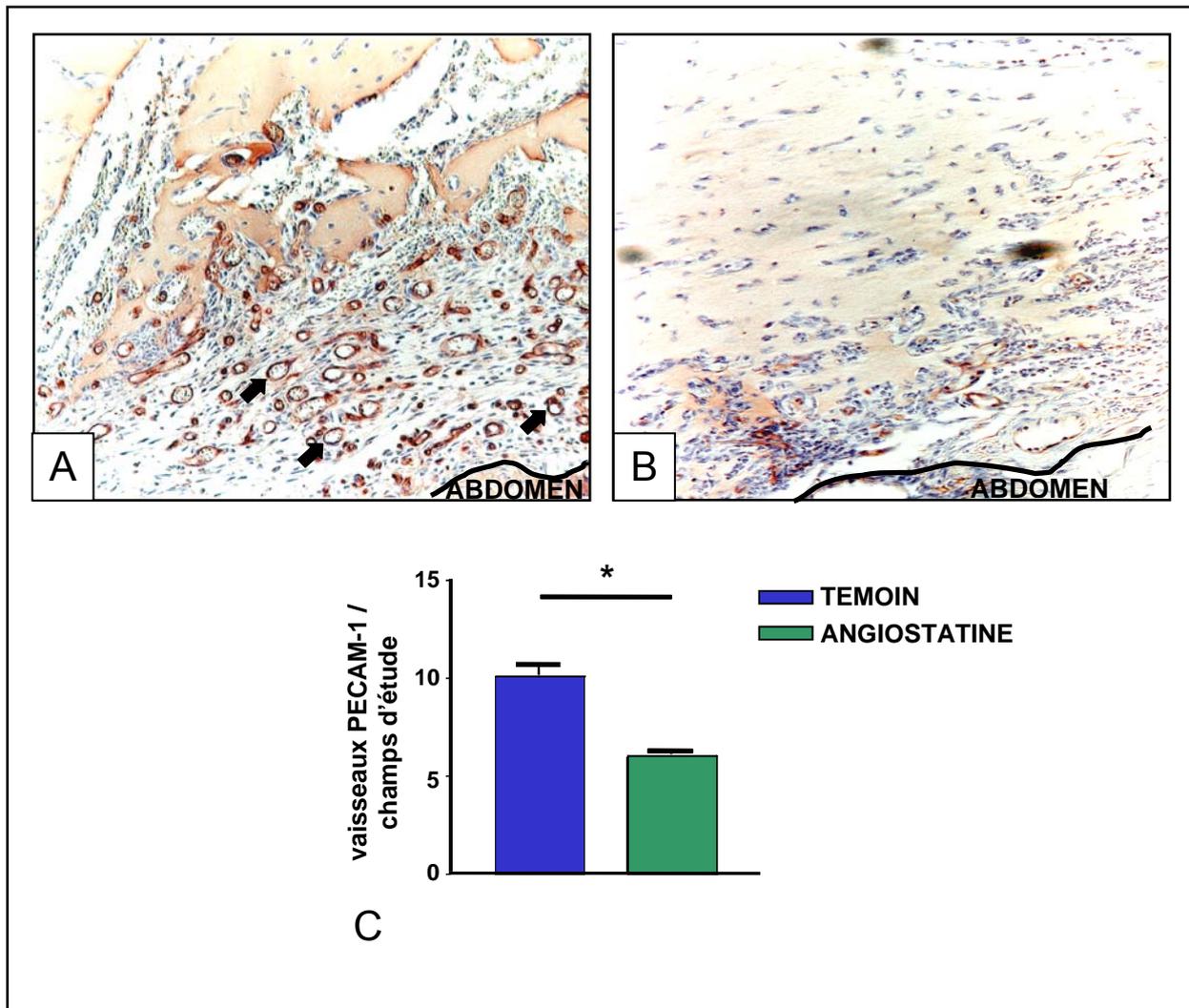


Figure 18: Effet de l'angiostatine sur la réponse angiogénique après 7 jours chez la souris normale.

A-B: Immunomarquage des cellules endothéliales présentes dans le Matrigel. Le gel supplémenté en angiostatine (B) possède moins de vaisseaux positifs pour la molécule PECAM-1 que le gel témoin (A); grossissement x20.

C: Quantification des vaisseaux marqués pour la molécule PECAM-1 par champs d'étude. Le nombre de vaisseaux marqués dans les gels supplémentés en angiostatine est significativement inférieur à celui des gels contrôles (n=4); *P<0,05; test de Mann-Whitney.

Dans ces conditions expérimentales, l'ajout d'angiostatine dans le Matrigel réduit le nombre de vaisseaux sanguins formés.

B. Rôle du récepteur P2Y₁ dans la réponse angiogénique

Dans le but d'étudier le rôle du récepteur P2Y₁ dans la réponse angiogénique, le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel a été appliqué à des souris déficientes pour l'expression de ce récepteur (Léon, Hechler et al. 1999). Les souris KO P2Y₁ ont été générées sur fond génétique mixte C57BL/6 x 129SV et croisées sur fond génétique C57BL/6 pendant sept générations de façon à obtenir un fond génétique pur (Léon, Hechler et al. 1999). Des souris mâles âgées de 8 à 10 semaines ont été utilisées dans l'ensemble des expériences ci-dessous.

Le Matrigel a été injecté à des souris normales (témoins) et KO P2Y₁, puis prélevé et analysé. La cellularité des gels des souris témoins et KO P2Y₁ n'est pas différente après 7 et 14 jours (12,8 % ± 0,6 pour les témoins contre 14,3 % ± 1,4 pour les KO P2Y₁ au 7^e jour, et 12,7 % ± 0,2 pour les témoins contre 10,7 % ± 1,1 pour les KO P2Y₁ au 14^e jour) (**figure 19A**). De même, les dosages de l'hémoglobine contenue dans les gels issus des souris des deux génotypes ne sont pas différents après 7 et 14 jours (0,19 mg hémoglobine/mg Matrigel pour les témoins contre 0,19 mg pour les KO P2Y₁ au 7^e jour, et 0,19 mg hémoglobine/mg Matrigel pour les témoins contre 0,2 mg ± 0,1 pour les KO P2Y₁ au 14^e jour) (**figure 19B**). Concernant le nombre de vaisseaux néoformés dans les gels, aucune différence significative n'est observée entre les deux génotypes (**figures 19C et D**). Le marquage immunohistochimique des macrophages, des neutrophiles et des cellules musculaires lisses ne révèle pas de différence dans la composition cellulaire des Matrigels (non montré).

Comme décrit en pages 64-68, la réponse angiogénique obtenue dans le Matrigel lors de l'ajout du cocktail des trois facteurs VEGF, FGF-2 et S1P est caractérisée par un envahissement cellulaire important et la formation de nombreux vaisseaux sanguins. Afin d'écartier la possibilité que la réponse angiogénique induite par ce cocktail soit trop importante pour observer un rôle du récepteur P2Y₁ dans ce modèle, des expériences d'injection de Matrigel contenant uniquement du FGF-2 (250 ng/mL) ont été réalisées. Cette condition permet d'obtenir une réponse angiogénique plus modérée dans le gel (Nagata, Mogi et al. 2003). Au 7^e jour, la cellularité obtenue est d'environ 10 % chez les souris témoins et KO P2Y₁, et le contenu en vaisseaux positifs pour la molécule PECAM-1 n'est pas différent (**figure 20**).

L'ensemble de ces données démontre d'une part que la réponse angiogénique induite par l'ajout de FGF-2 seul est caractérisée par un nombre plus faible de vaisseaux présents

dans les gels par rapport à celle observée avec le cocktail de facteurs de croissance. D'autre part, l'absence du récepteur P2Y₁ ne semble pas affecter l'angiogenèse dans ce modèle d'étude et dans les conditions expérimentales utilisées.

L'application de ce modèle à des souris déficientes pour l'expression du récepteur à l'ADP, P2Y₁, avait pour but d'étudier l'implication de ce récepteur dans l'angiogenèse. Etant donné que ce récepteur est exprimé sur la plupart des cellules qui participent à l'angiogenèse, à savoir les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les leucocytes et les plaquettes sanguines (Burnstock 2002; Di Virgilio and Solini 2002; Gachet 2006), un rôle de ce récepteur a été envisagé. Hors, d'après les résultats obtenus, il apparaît que ce récepteur ne semble pas jouer un rôle majeur dans les mécanismes régulant la réponse angiogénique dans ce modèle. Alors que l'absence de l'enzyme CD39 dans ce modèle inhibe la migration des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des macrophages, avec pour conséquence, une absence totale de nouveaux vaisseaux formés dans le gel (Goepfert, Sundberg et al. 2001), l'absence du récepteur P2Y₁ n'a pas de conséquence, ni sur la migration cellulaire, ni sur la formation de vaisseaux sanguins dans le Matrigel. Cette observation suggère deux hypothèses : i) l'enzyme CD39 possède un rôle direct et important dans les fonctions des cellules impliquées dans la réponse angiogénique ; ii) des récepteurs P2, autres que P2Y₁, présents à la surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des cellules de l'inflammation, participent à la régulation de la migration de ces cellules et aux autres mécanismes liés à l'angiogenèse. Ce modèle d'étude de l'angiogenèse, appliqué à des souris déficientes pour l'expression d'autres récepteurs P2, permettra d'identifier ceux impliqués dans ces mécanismes. L'absence de fonction du récepteur P2Y₁, dans ce modèle d'angiogenèse, ne signifie pas que ce récepteur est entièrement dépourvu de rôle régulateur dans d'autres conditions où l'angiogenèse est impliquée. L'utilisation d'autres modèles *in vivo* permettra de conclure sur le rôle de ce récepteur dans l'angiogenèse.

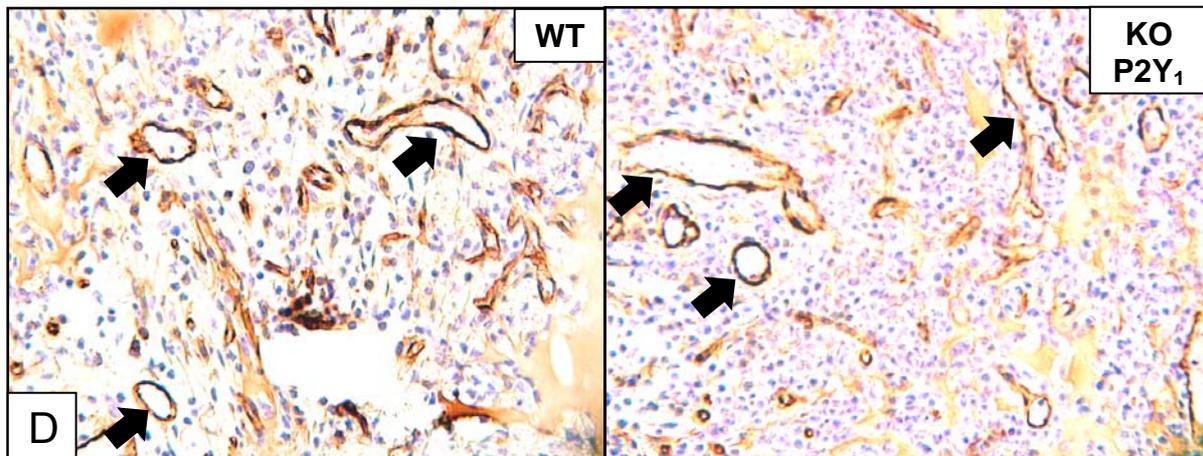
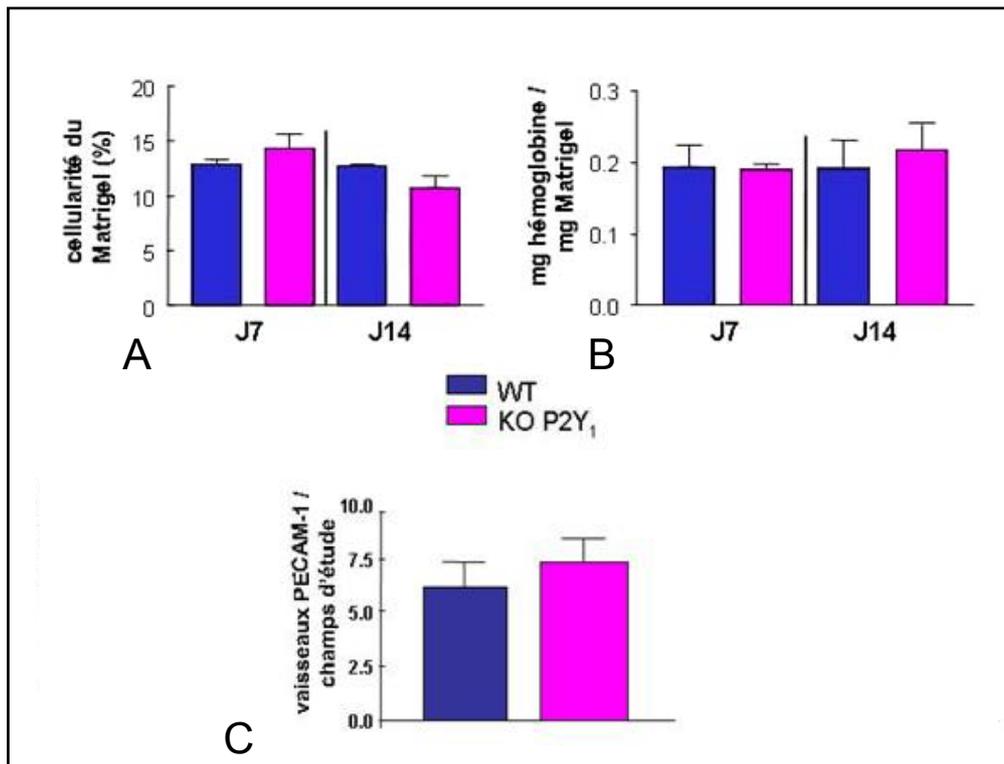


Figure 19: Effet de l'inactivation du gène codant pour le récepteur P2Y₁.

A: Cellularité des gels après 7 et 14 jours. L'absence du récepteur P2Y₁ n'affecte pas la cellularité des gels à 7 et 14 jours (n=4).

B: Contenu en hémoglobine des gels après 7 et 14 jours. Il n'y a pas de différence significative dans le contenu en hémoglobine des gels provenant des souris KO P2Y₁ et ceux provenant des souris témoins (n=6).

C: Quantification des vaisseaux positifs pour la molécule PECAM-1 par champs d'étude après 7 jours. Le nombre de vaisseaux marqués n'est pas différent entre les deux génotypes (n=4).

D: Immunomarquage des cellules endothéliales présentes dans les Matrigels après 7 jours. Souris témoins (à gauche) et souris KO P2Y₁ (à droite) ; grossissement x40.

L'absence du récepteur P2Y₁ ne semble pas modifier la réponse angiogénique.

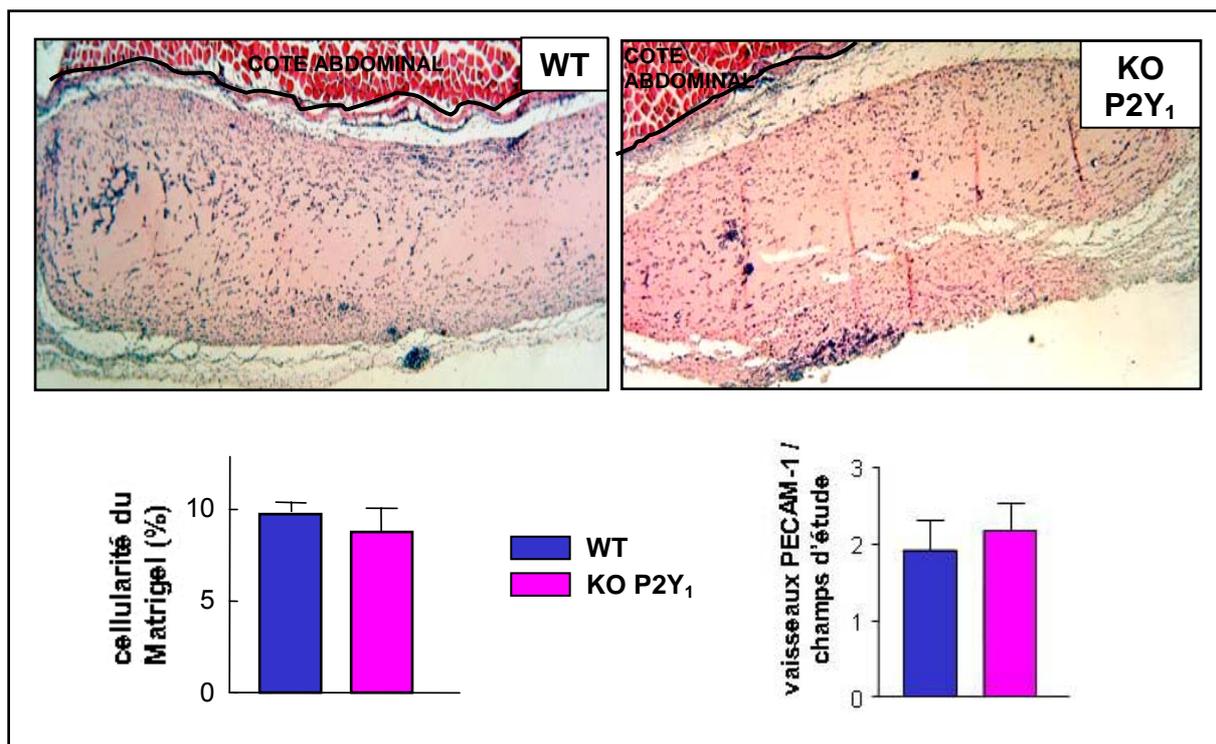


Figure 20: Effet de l'inactivation du gène codant pour le récepteur P2Y₁ dans le modèle de Matrigel supplémenté de FGF-2 250 ng/mL, après 7 jours.

En haut: colorations en HE de coupes de Matrigels représentatifs du résultat obtenu chez les souris témoins (à gauche) et les souris KO P2Y₁ (à droite) ; grossissement x4.

En bas: quantification de la cellularité des gels (à gauche) et des vaisseaux sanguins positifs pour la molécule PECAM-1 par champs d'étude (à droite) après 7 jours ; (n=4).

La réponse angiogénique observée en réponse à l'ajout de FGF-2 seul est moins soutenue que celle induite par le cocktail de facteurs de croissance. Elle est caractérisée par un envahissement cellulaire plus faible et peu de vaisseaux sanguins formés. Les résultats obtenus pour les souris contrôles sont similaires à ceux des souris KO P2Y₁.

L'absence du récepteur P2Y₁ ne semble pas modifier la réponse angiogénique dans ces conditions expérimentales.

C. Effet des thiénoxyridines sur la réponse angiogénique

Le récepteur à l'ADP P2Y₁₂ est une cible thérapeutique bien établie puisque la ticlopidine et le clopidogrel, antagonistes irréversibles de ce récepteur, sont de puissants médicaments antithrombotiques utilisés en clinique (Gachet 2006). Par ailleurs, des études antérieures ont démontré que la ticlopidine, administrée à des patients, réduit la progression de la rétinopathie diabétique (TIMAD 1990; De La Cruz, Arrebola et al. 2003), une pathologie où l'angiogenèse est en excès. Trois hypothèses peuvent expliquer cette observation : i) un rôle des plaquettes sanguines dans cette pathologie *via* leur récepteur P2Y₁₂ ; ii) l'implication de ce récepteur dans un mécanisme régulant l'angiogenèse *via* son expression dans d'autres types cellulaires, comme les cellules musculaires lisses (Wihlborg, Wang et al. 2004) ; iii) des propriétés antiangiogéniques de la ticlopidine indépendantes de son action sur le récepteur P2Y₁₂. Afin d'étudier l'hypothèse d'un rôle de ce récepteur dans l'angiogenèse, le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel a été appliqué à des souris contrôles traitées au clopidogrel. Ce traitement pharmacologique permet l'inhibition sélective de ce récepteur et inhibe l'activation plaquettaire. Un groupe de souris normales mâles C57BL/6, âgées de 8 à 10 semaines, a été gavé avec du clopidogrel (50 mg/kg de souris) dissout dans 5 % de gomme arabique. Le gavage a été effectué la veille et 2 heures avant l'injection de Matrigel, puis quotidiennement pendant 7 jours. La dose de 50 mg/kg de souris/jour permet l'inhibition de la totalité des récepteurs P2Y₁₂ plaquettaires (Gachet, Cattaneo et al. 1995). En parallèle, un groupe témoin composé de souris normales a reçu de la gomme arabique seule. Le clopidogrel (Plavix®) a été gracieusement fourni par Sanofi-Aventis (Toulouse, France).

1. Effets du clopidogrel

Après 7 jours, les Matrigels des souris traitées au clopidogrel sont caractérisés par la présence de lacs sanguins hémorragiques dépourvus de structures vasculaires et de cellules endothéliales bordantes (**figures 21A et B**). L'absence spécifique de cellules endothéliales délimitant la zone hémorragique est démontrée en **figure 23B** par l'absence d'immunomarquage de la molécule PECAM-1. En dehors de cette zone, des vaisseaux fonctionnels positifs pour la molécule PECAM-1 sont observés et leur nombre est significativement inférieur dans les gels des souris traitées au clopidogrel ($4,4 \pm 1$

vaisseaux/champs d'études contre $7,1 \pm 0,6$ pour les souris témoins, $P=0,0496$, $n=4$) (**figure 21C**). Le traitement au clopidogrel n'induit pas de différence dans la composition des Matrigels en macrophages, neutrophiles et cellules musculaires lisses (non montré). De nouvelles injections de Matrigel, afin d'évaluer le contenu en hémoglobine des gels des souris traitées au clopidogrel ou non, n'ont pas été réalisées car la coloration en hématoxyline-éosine des lacs sanguins est suffisante pour révéler la différence. Concernant la cellularité des gels, il n'y a pas de différence entre les deux groupes de souris ($17,6 \% \pm 1,9$ pour les souris traitées au clopidogrel contre $16 \% \pm 1,5$ pour les souris témoins, $n=4$) (**figure 21D**).

Ces résultats suggèrent que le traitement au clopidogrel entraîne une hémorragie dans le gel. A ce stade, différentes hypothèses peuvent être avancées: i) le clopidogrel, de part son effet antiplaquettaire, est responsable de l'aspect hémorragique des Matrigels ; ii) il possède également des effets antiangiogéniques responsables de l'inhibition de l'organisation des cellules endothéliales en vaisseaux et de leur absence de stabilisation. Les lacs sanguins pourraient résulter non seulement de l'effet antiplaquettaire du clopidogrel mais aussi de la déstabilisation des vaisseaux sanguins.

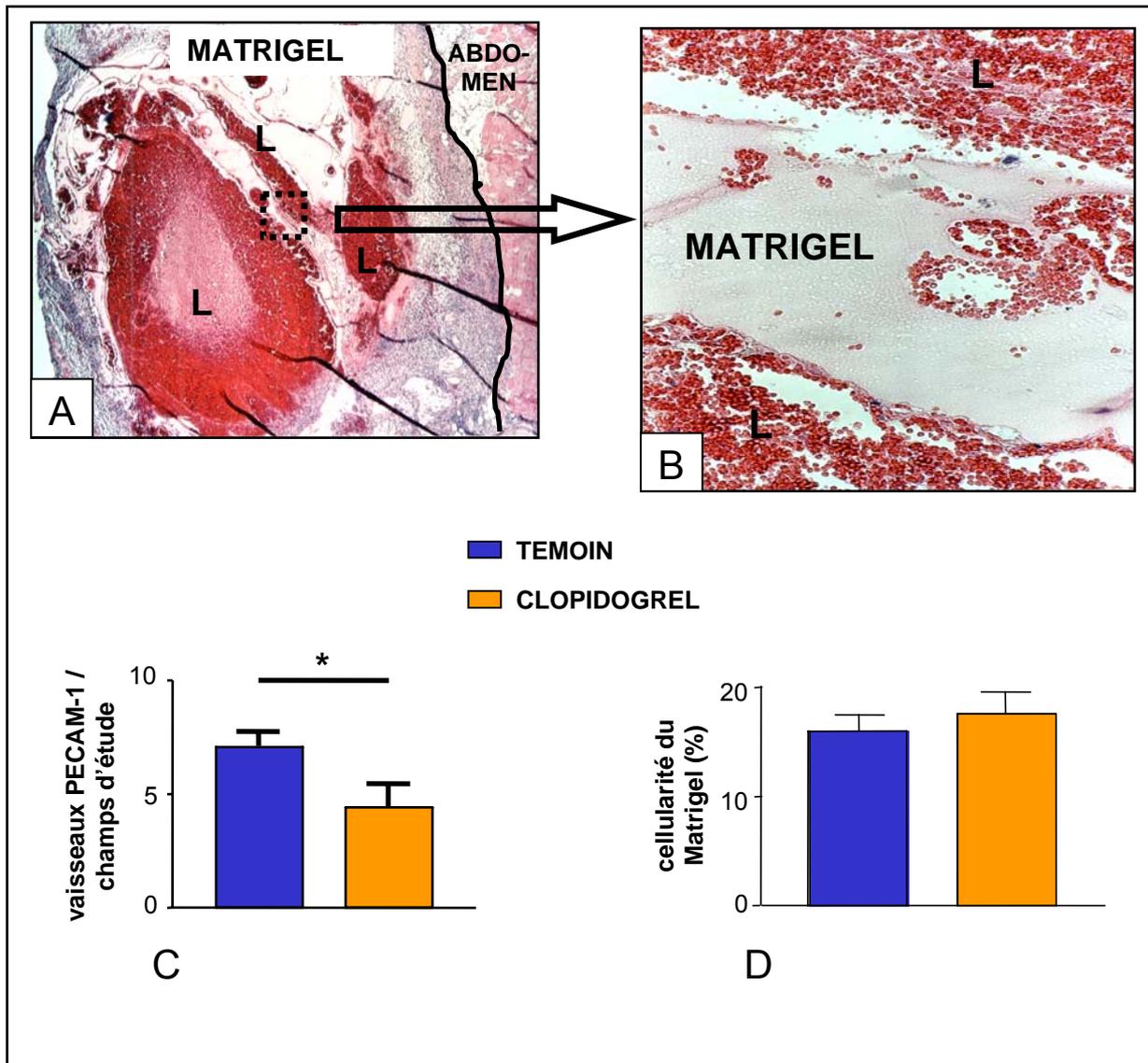


Figure 21: Effet du traitement au clopidogrel sur la réponse angiogénique après 7 jours.

A-B: Colorations en HE d'une coupe de Matrigel prélevé chez une souris traitée au clopidogrel après 7 jours (grossissements x4 et x40). Des lacs sanguins (L), caractérisés par l'absence de cellules bordantes, occupent le Matrigel.

C: Quantification des vaisseaux positifs pour la molécule PECAM-1 par champs d'étude après 7 jours. Le traitement des souris au clopidogrel entraîne une diminution significative du nombre de vaisseaux positifs pour la molécule PECAM-1 présents dans les gels par rapport aux souris contrôles (n=4). *P<0,05 ; test de Mann-Whitney.

D: Cellularité des gels après 7 jours. La cellularité des gels provenant des souris traitées au clopidogrel n'est pas significativement différente de celle des gels provenant des souris témoins à 7 jours (n=4). Le traitement au clopidogrel est responsable de la formation de zones d'aspect hémorragique dans le Matrigel.

2. Effets de l'énantiomère inactif du clopidogrel

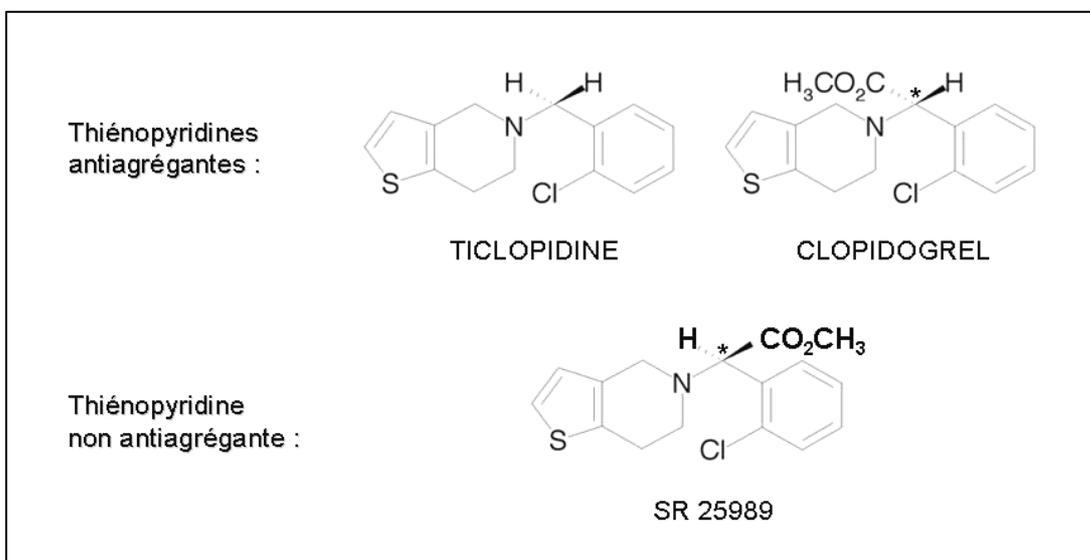


Figure 22: Structures chimiques des thiénoypyridines.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'effet antiangiogénique du clopidogrel observé ci-dessus serait indépendant de sa propriété inhibitrice du récepteur P2Y₁₂, des expériences ont été réalisées avec le SR25989, l'énantiomère du clopidogrel (**figure 22**), dépourvu d'activité antiagregante (Defreyn, Gachet et al. 1991). Des études antérieures ont mis en évidence des propriétés antiangiogéniques de ce composé *in vitro* et dans un modèle d'angiogenèse tumorale *in vivo* chez la souris (Mah-Becherel, Ceraline et al. 2002). Des injections de Matrigel contenant le cocktail de facteurs de croissance ont été réalisées chez des souris normales traitées au SR25989, dans les mêmes conditions expérimentales que le traitement au clopidogrel. En parallèle, un groupe de souris normales a reçu du clopidogrel et un groupe de souris normales a reçu de la gomme arabique seule. Après 7 jours, les gels ont été prélevés, fixés, puis analysés histologiquement. La formation de lacs sanguins hémorragiques se retrouve à nouveau dans le groupe de souris traitées au clopidogrel (n=4) (**figure 23A**), mais également dans le groupe de souris traitées au SR25989 (n=4) (**figure 23C**). De plus, aucune différence dans la cellularité et la composition en cellules des gels n'est observée entre les deux composés. Comme pour le traitement au clopidogrel, le bord des lacs sanguins présents dans les gels des souris traitées au SR25989 est caractérisé par

l'absence de cellules positives pour la molécule PECAM-1, suggérant ainsi un défaut de présence de cellules endothéliales bordantes (**figures 23B et D**).

L'ensemble de ces données démontre que le traitement au clopidogrel ou à son énantiomère inactif induit la formation de lacs sanguins hémorragiques dans ce modèle.

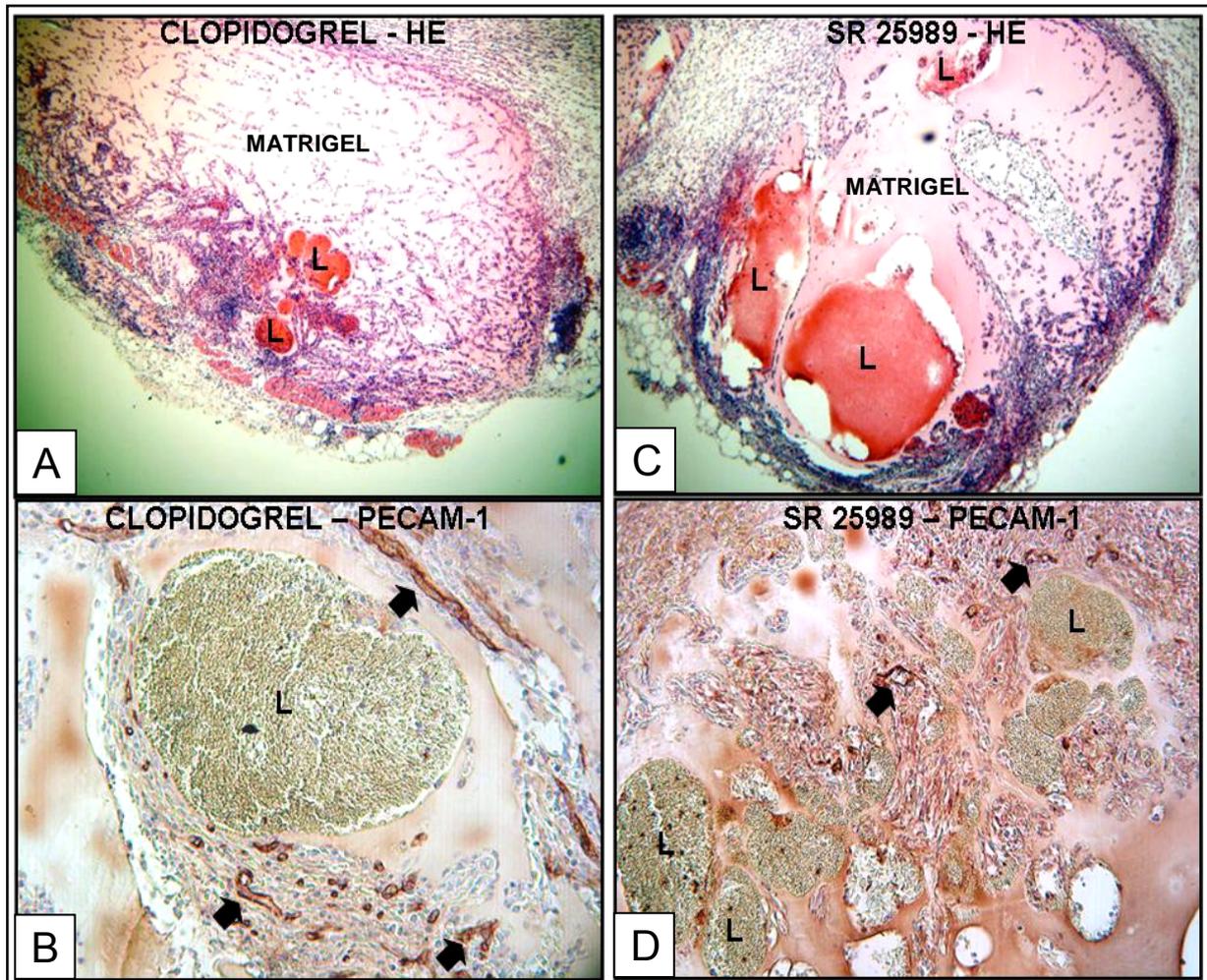


Figure 23: Effet du SR25989 sur la réponse angiogénique après 7 jours.

A-C: Colorations en HE de coupes représentatives de Matrigels prélevés chez les souris traitées au clopidogrel (A) ou au SR25989 (C) durant 7 jours. Les traitements au clopidogrel et au SR25989 induisent la formation de lacs sanguins (L) dans les gels (n=4) ; grossissement x4.

B-D: Immunomarquage des cellules endothéliales à l'aide d'un anticorps anti-PECAM-1 sur des coupes de Matrigels prélevés chez les souris traitées au clopidogrel (B) ou au SR25989 (D) durant 7 jours. Les bords des lacs sanguins (L) sont dépourvus de cellules endothéliales positives pour la molécule PECAM-1, alors qu'on note un marquage brun intense de petits vaisseaux sanguins (flèches pleines) ; grossissement x20.

Le traitement au clopidogrel et à son énantiomère dépourvu d'activité antiagrégante est responsable de la formation de zones d'aspect hémorragique dans le Matrigel.

Le traitement des souris au clopidogrel pendant les 7 jours d'implantation du Matrigel induit une diminution du nombre de vaisseaux sanguins néoformés alors qu'il n'affecte ni l'envahissement ni la composition cellulaires. Il est aussi et surtout responsable de la présence de lacs sanguins d'aspects hémorragiques dépourvus de cellules endothéliales délimitant une structure vasculaire. Dans la mesure où son énantiomère, le SR25989, qui est sans effet antiplaquettaire (Defreyn, Gachet et al. 1991), induit également la formation de zones hémorragiques, ceci suggère que le clopidogrel possède une activité antiangiogénique indépendante de la voie plaquettaire et qu'il pourrait avoir, comme le SR25989, un effet direct sur les cellules endothéliales. Son activité inhibitrice sur les cellules endothéliales serait responsable de la fragilisation et de la rupture de l'endothélium, accompagnée d'une perte sanguine renforcée par le fait qu'il inhibe les plaquettes sanguines. Cette hypothèse est renforcée par : i) la démonstration que le SR25989 augmente l'expression et la sécrétion d'un facteur antiangiogénique, la thrombospondine-1, par des cellules endothéliales en culture entraînant ainsi leur perte d'adhésion et leur apoptose (Klein-Soyer, Ceraline et al. 1997) ; ii) la mise en évidence d'un effet proapoptotique d'une autre thiénoypyridine, la ticlopidine (**figure 22**), sur des cellules endothéliales en culture (Mauro, Zlatopolskiy et al. 2004).

D. Rôle du récepteur P2Y₄ dans la réponse angiogénique

Ce travail fait l'objet d'une collaboration scientifique avec l'équipe du Professeur Jean-Marie Boeynaems de l'Université Libre de Bruxelles en Belgique. Cette équipe a établi les souris déficientes pour l'expression du récepteur P2Y₄ et les résultats présentés ci-après, s'intègrent dans un article en préparation (page 130).

Au niveau vasculaire, le récepteur P2Y₄ est exprimé dans les cellules musculaires lisses et dans des HUVEC (Jin, Dasari et al. 1998; Kunapuli and Daniel 1998; Wang, Karlsson et al. 2002). Son expression endothéliale varie selon le territoire vasculaire et la stimulation de cellules endothéliales par les agonistes de ce récepteur, l'ATP ou l'UTP, augmente la prolifération et la migration de cellules endothéliales de cœur de cobaye (Satterwhite, Farrelly et al. 1999). De plus, des études ont mis en évidence un effet de l'ATP et de l'UTP sur la migration de monocytes, de neutrophiles, de mastocytes et de cellules musculaires lisses (Verghese, Kneisler et al. 1996; McCloskey, Fan et al. 1999; Chaulet, Desgranges et al. 2001; Goepfert, Sundberg et al. 2001). L'ensemble de ces données indique que ce récepteur pourrait participer aux mécanismes régulant l'angiogenèse. Cependant, comme cité précédemment, il est difficile d'identifier la part liée au récepteur P2Y₄ par rapport à celle du récepteur P2Y₂, du fait de leur profil pharmacologique similaire. L'utilisation de souris déficientes pour l'expression de ce récepteur, dans le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel, permet de résoudre ce problème dans le contexte d'étude de l'angiogenèse. Les souris KO P2Y₄ ont été générées sur fond génétique mixte CD1 x 129SV (Robaye, Ghanem et al. 2003) et des souris normales de même fond génétique mixte ont été utilisées comme témoins. Des souris mâles âgées de 6 à 8 semaines ont été utilisées dans l'ensemble des expériences ci-dessous.

Après 14 jours d'implantation du Matrigel dans les souris témoins, des cellules ont envahi le gel (**figure 24**) et elles se situent au centre et en périphérie de celui-ci comme décrit précédemment (**figure 16, page 67**). La présence de vaisseaux sanguins fonctionnels et positifs pour la molécule PECAM-1 est également observée dans le gel (**figures 27A et B**). Ces résultats démontrent qu'une réponse angiogénique importante a été obtenue dans les souris témoins. Il est à noter que la réponse obtenue après 7 jours d'implantation des gels est faible contrairement à celle obtenue dans des souris normales C57BL/6 (non montré) et ceci peut s'expliquer par la différence de fonds génétiques entre les souris. Contrairement aux souris témoins, les gels provenant des souris KO P2Y₄ sont caractérisés par de grandes zones

au centre du Matrigel entièrement dépourvues de cellules et de vaisseaux sanguins (**figures 24 et 25**), et par la présence d'une large bande de cellules du côté abdominal (flèches pleines), plus ou moins accompagnée d'une accumulation de globules rouges en avant de celle-ci. De nombreuses « déchirures » du gel sont visibles ; elles sont le résultat d'une fragilisation lors de sa coupe en paraffine, due à sa faible colonisation cellulaire (Murray 2001). La quantification de la cellularité confirme que les gels provenant des souris KO P2Y₄ sont significativement moins envahis au centre, alors qu'aucune différence n'est observée pour le côté abdominal (**figure 24**). Ces observations suggèrent que, dans les souris KO P2Y₄, les cellules ne colonisent pas normalement l'intégralité du gel et que la réponse angiogénique est très perturbée.

Le marquage immunohistochimique des macrophages à l'aide d'un anticorps dirigé contre la molécule F4/80 démontre une présence de ces cellules tant du côté abdominal qu'au centre des gels de souris témoins (**figures 26B et C**). Par contre, dans les gels de souris KO P2Y₄, les macrophages sont localisés au niveau de la bande cellulaire située le long du côté abdominal (**figure 26B**). Au bord de cette bande cellulaire, en direction du centre du gel, on note la présence de zones totalement dépourvues de macrophages (**figure 26C**, zone en pointillé (Z)). Les macrophages de souris KO P2Y₄ semblent uniquement localisés en périphérie du gel et ils ne colonisent pas le centre de celui-ci. L'identification des cellules endothéliales par la molécule PECAM-1 révèle que ces cellules sont présentes et organisées en vaisseaux fonctionnels du côté abdominal et au centre des gels provenant des souris témoins (**figures 27A et B**). Mais, dans les gels de souris KO P2Y₄, des structures vasculaires positives pour PECAM-1 sont trouvées uniquement dans la bande d'accumulation cellulaire, du côté abdominal (**figure 27C**). Elles sont totalement absentes du centre du gel (**figure 27D**).

En conclusion, les résultats obtenus dans les souris KO P2Y₄ illustrent qu'après 14 jours d'implantation du gel, l'absence de ce récepteur semble être responsable d'une part, de l'accumulation importante de macrophages en périphérie et notamment du côté abdominal du gel et d'autre part, d'un défaut majeur de migration de l'ensemble des cellules. La conséquence est l'absence de toute structure vasculaire fonctionnelle au centre des gels. Il était intéressant d'étudier si cette perturbation dans la réponse angiogénique est, soit la conséquence de l'absence de ce récepteur dans les cellules impliquées dans la formation de vaisseaux sanguins (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses), soit le résultat de la délétion du récepteur dans les macrophages. Nous avons d'abord regardé si le récepteur P2Y₄ est exprimé par les macrophages de souris et cette étude fait l'objet du prochain chapitre.

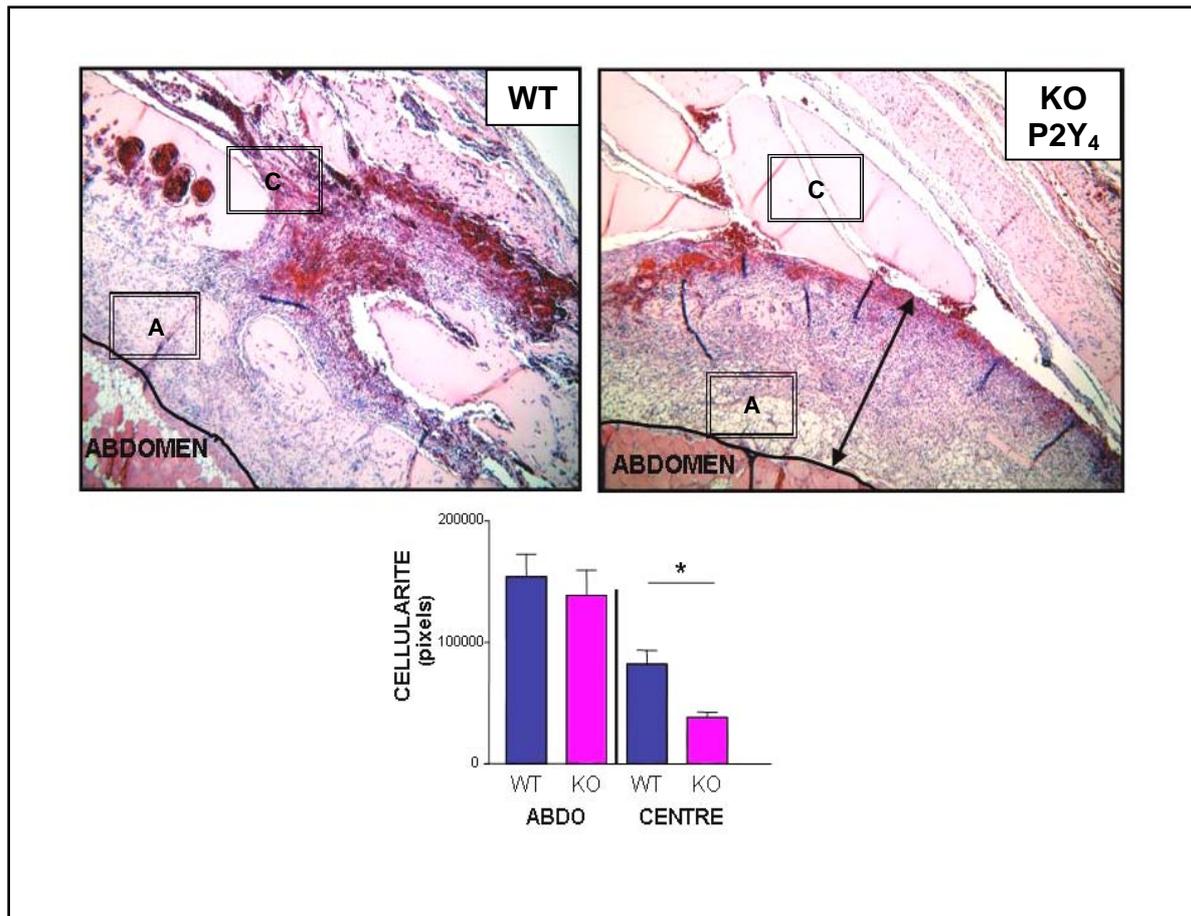


Figure 24: Quantification de la cellularité des Matrigels des souris témoins et KO P2Y₄ après 14 jours.

En haut : Coloration en HE de coupes de Matrigel de souris témoin (à gauche) et de souris KO P2Y₄ (à droite) ; les fenêtres renseignent sur la taille et la localisation des champs d'étude pour la quantification de la cellularité au centre (C) et du côté abdominal (A) du gel ; grossissement x10.

En bas : Mesure de la cellularité du centre et du côté abdominal (abdo) des Matrigels de souris témoins et KO P2Y₄ (n=6) ; *P<0.05 ; test de Mann-Whitney.

Les gels des souris KO P2Y₄ sont significativement moins envahis de cellules au centre que ceux des souris témoins.

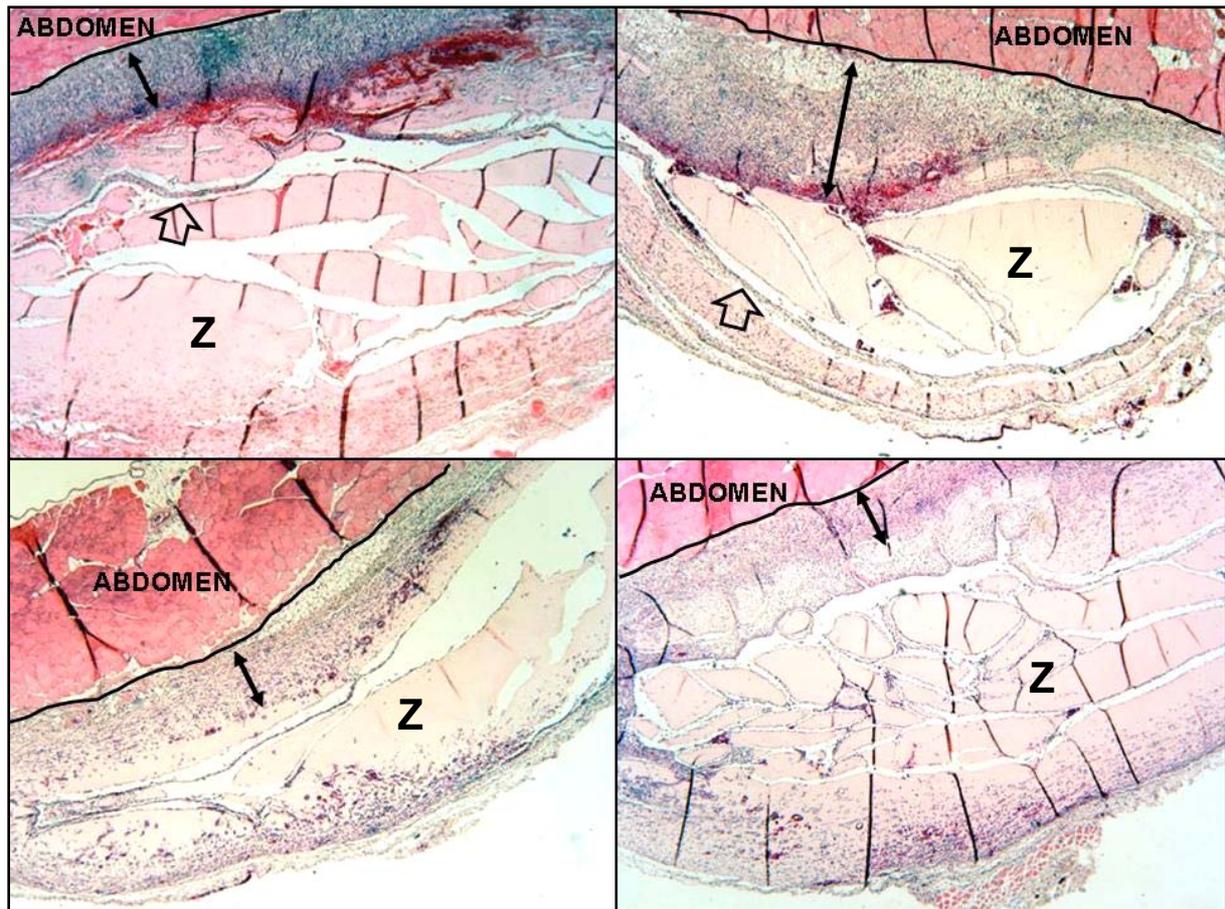


Figure 25: Colorations en hématoxyline-éosine des Matrigels provenant de souris KO P2Y₄ après 14 jours.

Chaque photo représente une coupe de Matrigel provenant d'une souris KO P2Y₄ (n=6, seulement 4 sont présentées ici). De grandes zones (Z) au centre du Matrigel sont dépourvues de cellules et de vaisseaux sanguins. Du côté abdominal, de larges bandes très denses en cellules sont représentées par les flèches pleines. Quelques cellules forment une couronne entourant une zone de Matrigel (flèches vides) ; grossissement x4.

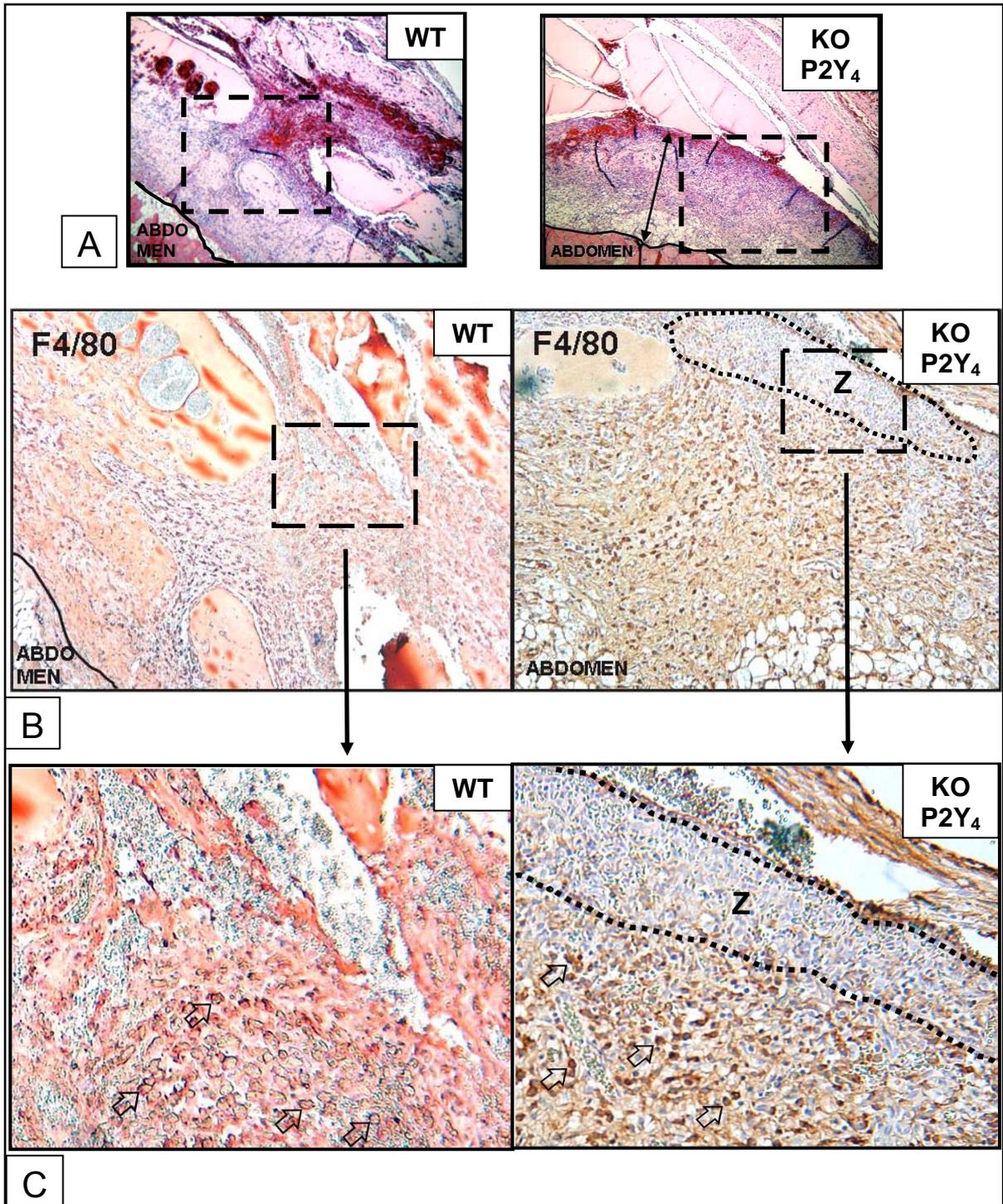


Figure 26: Immunomarquage des macrophages présents dans les Matrigels de souris témoins et KO P2Y₄ après 14 jours.

A : Colorations en HE de coupes de Matrigel de souris témoin (à gauche) et KO P2Y₄ (à droite) ; grossissement x10. **B :** Marquage F4/80 des macrophages du côté abdominal ; agrandissement des zones de Matrigel situées dans les rectangles en **A** ; souris témoin (à gauche) et KO P2Y₄ (à droite). **C :** Marquage F4/80 des macrophages à l'interface côté abdominal-centre du Matrigel ; agrandissement des zones de Matrigel situées dans les rectangles en **B** ; souris témoin (à gauche) et KO P2Y₄ (à droite).

La zone (Z) délimitée par les pointillés est entièrement dépourvue de macrophages chez les souris KO P2Y₄.

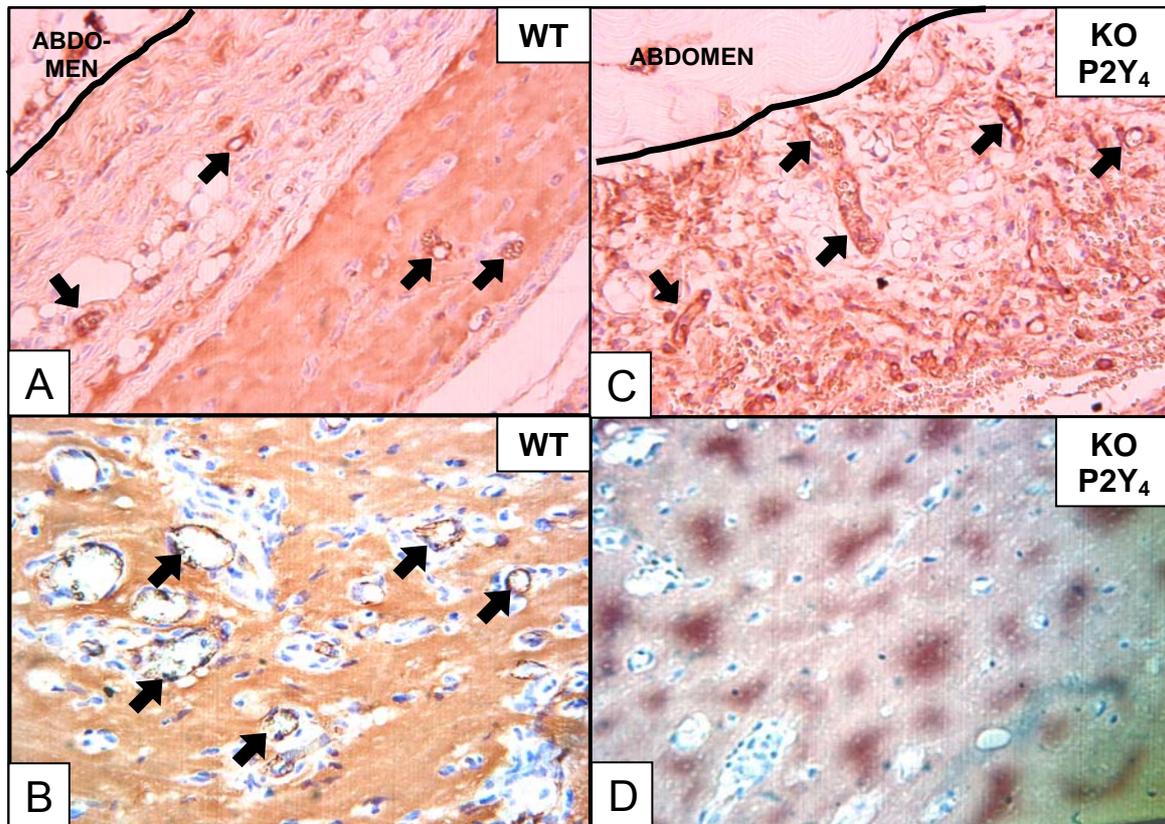


Figure 27: Immunomarquage des cellules endothéliales présentes dans les Matrigels de souris témoins et KO P2Y₄ après 14 jours.

A-B : Souris témoins : marquage PECAM-1 de cellules endothéliales (flèches pleines) du côté abdominal (**A**) et au centre du gel (**B**).

C-D : Souris KO P2Y₄ : marquage PECAM-1 de cellules endothéliales du côté abdominal (**C**) et au centre du gel (**D**) ; grossissement x10.

Les gels des souris témoins possèdent des vaisseaux sanguins au centre et du côté abdominal, alors que ceux provenant de souris KO P2Y₄ n'ont aucun vaisseau sanguin au centre.

E. Identification des récepteurs P2Y présents dans les macrophages de souris

Dans le but de vérifier la présence du récepteur P2Y₄ dans les macrophages de souris, des macrophages péritonéaux de souris normales ont été isolés après une injection intrapéritonéale de thioglycolate 3 %. Cette technique permet de recueillir un grand nombre de macrophages murins (White, Liebhaber et al. 2002). Des expériences de RT-PCR et de mesures de mouvements calciques intracellulaires, après une stimulation par des nucléotides, ont été effectuées afin d'identifier les récepteurs P2Y exprimés par ces cellules.

Isolement de macrophages péritonéaux de souris

Le protocole utilisé pour l'isolement de macrophages de péritoine de souris contrôle est celui publié par White et coll. (White, Liebhaber et al. 2002). Tout d'abord, une solution de thioglycolate (BD Biosciences) à 3 % dans de l'eau distillée est préparée et autoclavée pendant 15 min à 121°C. Cette solution stérile est protégée de la lumière et est stockée plusieurs jours avant l'expérience afin de lui permettre de s'enrichir en produits glyqués (la glycation est la réaction de liaison de sucres tels que les aldoses sur les groupements aminés libres des protéines). Cet enrichissement en produits glyqués augmente considérablement l'inflammation péritonéale après son injection (Li, Baviello et al. 1997). Un millilitre de la solution de thioglycolate 3 % est injecté en intrapéritonéal à une souris contrôle C57BL/6, puis un lavage péritonéal est effectué 4 jours après l'injection (Li, Baviello et al. 1997). Pour cela, une solution de 10 mL de BSS (25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 0,1 % sérum albumine humaine, pH 7,3) refroidie sur glace est injectée dans le péritoine de souris, puis le péritoine est massé pendant 30 secondes. A l'aide d'une aiguille implantée dans le péritoine et en pressant latéralement l'abdomen de la souris, la solution de BSS est récupérée dans un tube de 15 mL placé sur glace. En moyenne, 8 à 9 mL de BSS sont récupérés. La solution recueillie est ensuite centrifugée pendant 10 min à 200g et à 4°C, puis le culot est repris dans un tampon de lyse des globules rouges (Sigma Aldrich) pendant 10 min, afin d'éliminer les globules rouges contaminants. La réaction est stoppée par l'addition de 14 mL de PBS et le tout est centrifugé pendant 10 min à 200g et à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 10 mL de milieu de culture complet comprenant du RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté de 10 % sérum de veau fœtal et de PSG, puis le tout estensemencé dans une boîte de culture T75. Après 2 heures d'adhérence, le

milieu de culture est aspiré, la boîte est rincée deux fois avec du RPMI 1640 afin d'éliminer les cellules non-adhérentes contaminantes et du nouveau milieu de culture complet est ajouté. Cette technique permet de recueillir une population de cellules comprenant en moyenne 70 à 80 % de macrophages d'après le marquage F4/80 en cytométrie de flux (non montré).

Extraction d'ARN messagers des macrophages en culture et RT-PCR

Après avoir aspiré le milieu de culture, 5 mL de solution Triagent sont déposés dans une T75 contenant les macrophages en culture. L'extraction des ARN messagers s'effectue par traitement successif au chloroforme, isopropanol et éthanol 75 % selon le protocole fourni par Qiagen, puis une digestion à la DNase I (Amersham Biosciences) est effectuée afin d'éliminer tout l'ADN génomique contaminant. Le kit OneStep RT-PCR (Qiagen) est utilisé pour les réactions d'amplification des ARN messagers codant pour les différents récepteurs P2Y. Les conditions de RT-PCR sont les suivantes : 30 min à 50°C, 15 min à 95°C, (45 sec à 94°C, 45 sec à 57°C, 1 min à 72°C) x 40, 10 min à 72°C ; 1 µg d'ARN est utilisé pour la réaction de RT-PCR.

Les amorces pour amplifier les ARNm des récepteurs P2Y et EMR4 sont les suivantes :

P2Y ₁	sens	5' - ACA GTA CTG TCG CCT CAA CTG CAG CAG TTT - 3'
	antisens	5' - CCG AAG ATC CAG TCA GTC TTG TTG AAG TAG - 3'
P2Y ₂	sens	5' - CTG GAA TAG CAC CAT CAA TGG CAC C - 3'
	antisens	5' - GAT GCT GCA GTA GAG GTT GGT GTA G - 3'
P2Y ₄	sens	5' - TCG TCT ACT ACT ATG CTG CCA GAA AC - 3'
	antisens	5' - GTG GAA CTG AAG TAT ACG TAG TGG TC - 3'
P2Y ₆	sens	5' - TGC CAC TGA ACA TCT GCG TCA TTG C - 3'
	antisens	5' - CAA TAA CAA GCC AGT AAG GCT ATG AAG - 3'
P2Y ₁₃	sens	5' - CAA GAA CAC TCT GGT GGC AGA CTT G - 3'
	antisens	5' - CAC TTC TTC ACG GAT GAT GGC GTT G - 3'
EMR4 (Contrôle positif)	sens	5' - GGT ATG CAA GGA TGT GTC GTA CTG C - 3'
	antisens	5' - ACC ACT AGT GCA GTC AAC CTT CAT TG - 3'

Mesure des variations de la concentration intracellulaire de Ca²⁺

Après 24h de culture, les macrophages sont récoltés par un traitement à la trypsine-EDTA, puis centrifugés et repris dans une solution de BSS contenant 5 µM FURA-2/AM et 0,02 U/mL d'apyrase pendant 30 min à 37°C, à l'abri de la lumière. Les macrophages sont ensuite centrifugés et repris dans une solution de BSS en présence de 0,02 U/mL d'apyrase. Un millilitre de solution est déposé dans une cuvette en plastique de 10 × 10 mm maintenue à 37°C et les mesures de fluorescence s'effectuent sous agitation à l'aide d'un

spectrofluoromètre (Photon Technology International Inc, South Brunswick, NJ). La longueur d'excitation est alternativement de 340 ou 380 nm et l'émission de fluorescence est établie à 510 nm.

Une fois recueillis, les macrophages péritonéaux de souris ont été mis en culture afin d'éliminer les cellules non-adhérentes contaminantes, puis les ARNm de ces cellules ont été extraits et soumis à une réaction de RT-PCR. Des amorces pour amplifier les ARNm codant pour les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₃ et la protéine EMR4 (contrôle positif), qui est un récepteur transmembranaire spécifique des macrophages péritonéaux de souris (Stacey, Lin et al. 2001), ont été utilisées. Au moment où ces expériences ont été réalisées, aucune étude scientifique n'avait alors permis d'identifier précisément les récepteurs P2Y exprimés dans des macrophages de souris.

Le dépôt des produits de réaction de RT-PCR sur un gel d'agarose démontre que les macrophages récoltés expriment les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₃ et le récepteur EMR4 (**figure 28**), mais qu'ils ne possèdent pas le récepteur P2Y₄. Afin d'éliminer la possibilité que le recrutement de ces cellules par le thioglycolate entraîne une inhibition de l'expression du récepteur P2Y₄, des macrophages non-activés ont été récoltés par simple lavage péritonéal avec une solution de BSS. Ces macrophages ont été mis en culture puis traités de manière identique que précédemment. Le profil d'expression des récepteurs P2Y de ces cellules ne varie pas en fonction de leur état d'activation (**figure 28**).

Des expériences de mesures de mouvements calciques au sein des macrophages ont permis de démontrer que la stimulation par de l'ATP ou de l'UTP induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et que cette réponse est désensibilisable. En effet, une seconde stimulation n'entraîne pas d'augmentation du signal de fluorescence (**figure 29A**). D'après les résultats des expériences de RT-PCR (**figure 28**), il semble que le récepteur P2Y₂, et non P2Y₄, soit à l'origine de ces réponses calciques. L'ajout de 2-MeSADP, agoniste du récepteur P2Y₁, induit une augmentation de la concentration intracellulaire calcique et cette réponse est inhibée en présence de l'antagoniste de ce récepteur, le MRS2179 (**figure 29B**). Ceci confirme les données de RT-PCR sur l'expression du récepteur P2Y₁ dans ces cellules. D'ailleurs, des macrophages péritonéaux isolés de souris KO P2Y₁ ne répondent pas à une stimulation répétée au 2-MeSADP. Ces cellules ont également répondu à l'UDP confirmant la présence de récepteurs P2Y₆ (non montré).

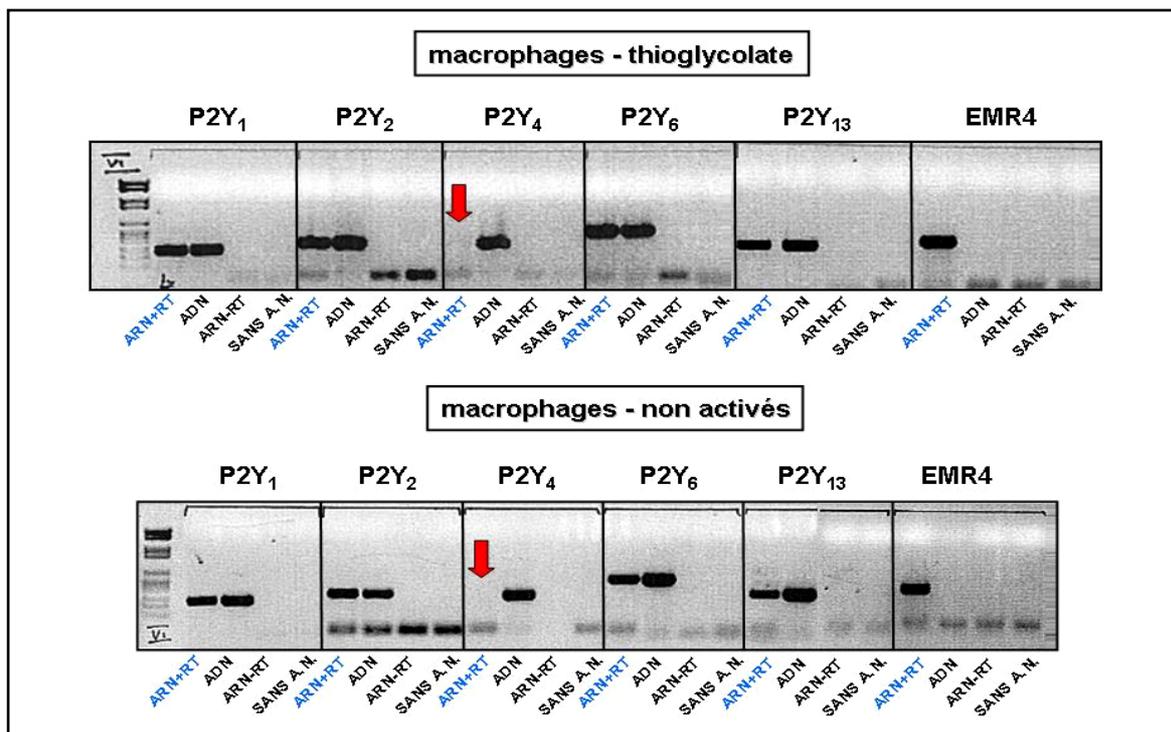


Figure 28: Profil d'expression des ARNm codants pour les récepteurs P2Y dans les macrophages péritonéaux de souris.

En haut : Profil d'expression d'ARNm codant pour des récepteurs P2Y dans des macrophages de souris récoltés par lavage péritonéal avec une solution de BSS, quatre jours après l'injection intrapéritonéale de thioglycolate 3%.

En bas : Profil d'expression d'ARNm codant pour des récepteurs P2Y dans des macrophages de souris récoltés par simple lavage péritonéal avec une solution de BSS. RT = reverse transcription ; AN = acides nucléiques ; EMR4 : contrôle positif.

Les macrophages péritonéaux isolés de souris, activés ou non par du thioglycolate, expriment les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆ et P2Y₁₃ mais pas le récepteur P2Y₄ (flèches rouges).

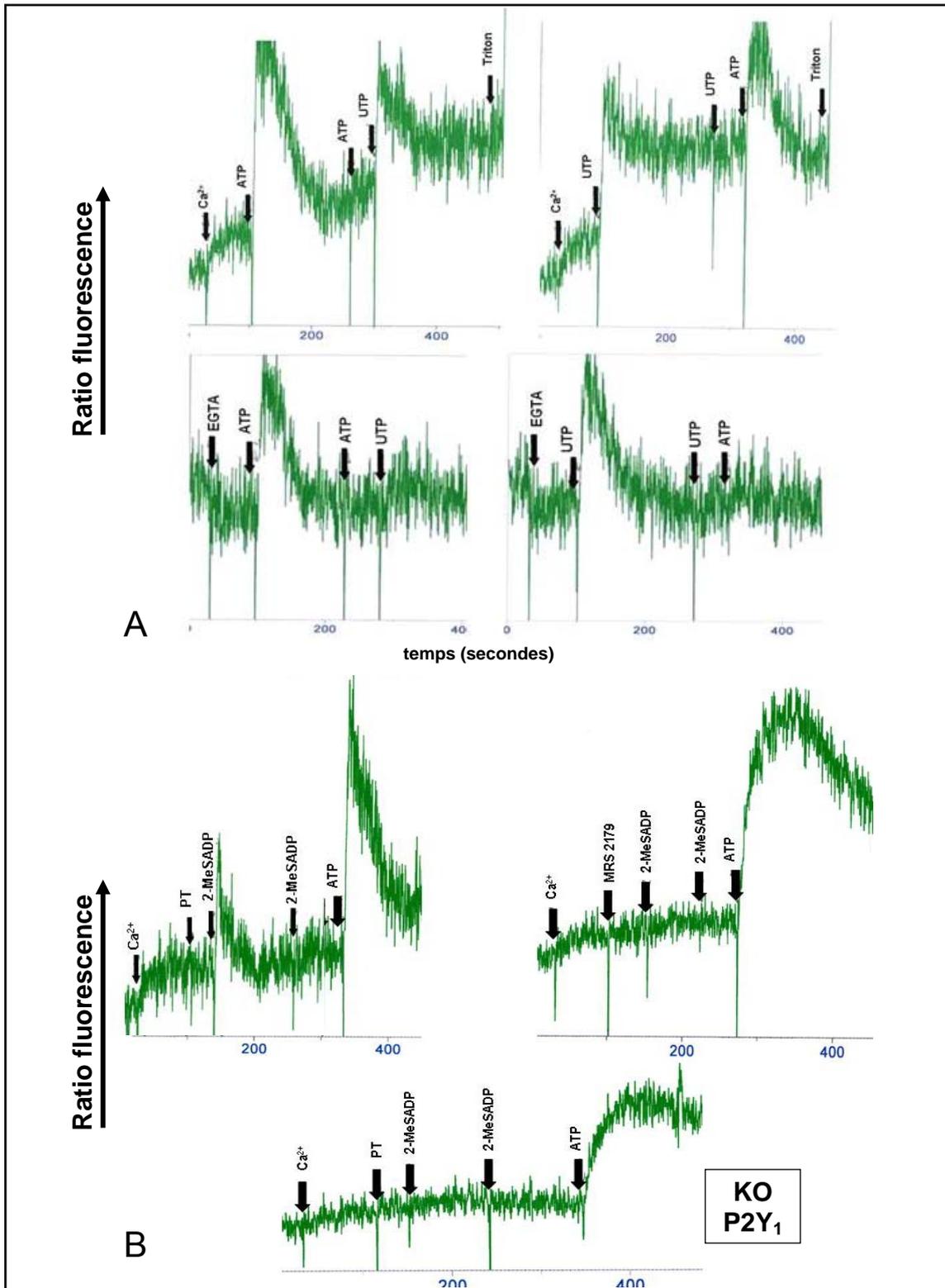


Figure 29: Tracés des variations intracellulaires de la concentration de Ca^{2+} dans les macrophages péritonéaux de souris après stimulation par différents agonistes.

A : Stimulation de macrophages de souris contrôles par de l'ATP 10^{-4}M et de l'UTP 10^{-4}M . **B :** Stimulation de macrophages de souris contrôles et KO P2Y_1 par du 2-MeSADP 10^{-6}M en présence ou non de MRS2179 10^{-4}M ; PT = Plain Tyrode. Les macrophages contrôles répondent à des stimulations à l'ATP et à l'UTP et leur réponse au 2-MeSADP est inhibée par le MRS2179. Les macrophages KO P2Y_1 ne répondent pas au 2-MeSADP.

D'après les résultats obtenus dans les macrophages de souris, il semble que le défaut observé dans la réponse angiogénique dans le Matrigel ne soit pas la conséquence de l'absence de ce récepteur à la surface des macrophages puisque celui-ci n'y est pas exprimé chez les souris témoins. L'accumulation de cellules au niveau abdominal des gels des souris KO peut alors s'expliquer par deux hypothèses. La première serait que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, qui expriment normalement ce récepteur, présenteraient une migration altérée, accompagnée d'un défaut d'organisation et de stabilisation en vaisseaux sanguins entraînant ainsi un avortement de la réponse angiogénique. Cette hypothèse est confortée par des études impliquant les agonistes du récepteur P2Y₄, l'ATP et l'UTP, dans la migration et la prolifération de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses (Satterwhite, Farrelly et al. 1999; Chaulet, Desgranges et al. 2001). La seconde serait que l'absence de ce récepteur est responsable d'un défaut de recrutement des macrophages dans le gel. Comme ces cellules participent activement aux mécanismes régulant la réponse angiogénique (Sunderkotter, Steinbrink et al. 1994; Condeelis and Pollard 2006), ce défaut peut perturber l'envahissement du gel par les autres types cellulaires et la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins. Cette hypothèse est envisageable dans la mesure où des données obtenues avec des cellules endothéliales primaires isolées de cœurs de souris suggèrent que l'absence du récepteur P2Y₄ induit une diminution significative du nombre de molécules VCAM-1 exprimées à leur surface, en réponse à l'UTP, et une adhésion moindre de monocytes (page 130). Cette molécule étant impliquée dans le recrutement de monocytes à la surface de l'endothélium dans un contexte inflammatoire, cette altération peut être à l'origine d'une transmigration monocyttaire réduite ainsi qu'une diminution du nombre de macrophages présents au niveau sous-endothélial, avec pour conséquence, une réponse angiogénique perturbée. Cette hypothèse pourrait également expliquer que l'absence de ce récepteur entraîne une inhibition de l'angiogenèse dans le modèle par injection d'huile de croton dans une poche d'air faite dans le dos des souris (page 130).

Alors que l'absence du récepteur P2Y₁ ne semble pas perturber l'angiogenèse dans ce modèle, le défaut d'expression du récepteur P2Y₄ est responsable d'une réponse angiogénique altérée. Ces résultats étant très proches de ceux observés avec les souris KO CD39 (Goepfert, Sundberg et al. 2001), il est possible que la désensibilisation du récepteur P2Y₄ soit à l'origine du défaut de la réponse angiogénique dans ces souris. Cependant, les récepteurs P2Y₂ et P2Y₄ ont une pharmacologie similaire et une distribution cellulaire proche (von Kugelgen 2006), et la désensibilisation du récepteur P2Y₂ pourrait aussi affecter cette

réponse. Cette hypothèse serait intéressante à étudier dans le même modèle d'angiogenèse appliqué à des souris déficientes pour l'expression du récepteur P2Y₂.

F. Etude du rôle du récepteur P2Y₁ dans les fonctions endothéliales

Dans une deuxième partie de ma thèse, les travaux ont été consacrés à l'isolement et à la caractérisation de cellules endothéliales isolées à partir de cœurs et de poumons de souris. L'objectif de ce travail est de pouvoir disposer, au laboratoire, d'un outil pour l'étude des fonctions de cellules endothéliales provenant de différentes lignées de souris transgéniques. Dans le cadre de la compréhension du rôle des récepteurs P2Y dans l'angiogenèse, nous avons isolé et caractérisé des cellules endothéliales de souris normales et de souris KO P2Y₁ que nous disposons au laboratoire. Ces cellules permettent d'étudier le rôle joué par ce récepteur dans les fonctions endothéliales et d'envisager son implication dans des processus angiogéniques. Enfin, l'obtention de cellules endothéliales de souris dépourvues de l'expression d'autres récepteurs P2Y permettra d'élargir l'étude de ces récepteurs dans la régulation endothéliale.

Afin de recueillir des cellules endothéliales pures en grande quantité, la technique d'immortalisation par un rétrovirus murin a été choisie. En effet, l'isolement de cellules endothéliales primaires à partir d'un organe selon les techniques décrites en pages 54 et 55 possède plusieurs limites ; premièrement, ces techniques permettent d'obtenir une culture de cellules endothéliales très souvent contaminée par la présence d'autres types cellulaires très difficiles à éliminer. Ceci explique le faible rendement de ces techniques. Deuxièmement, la culture de cellules endothéliales primaires est limitée par le faible nombre de passage que tolèrent ces cellules avant leur changement de phénotype (perte de l'expression de fvW par exemple). C'est pourquoi, il est intéressant de transformer spécifiquement des cellules endothéliales de telle façon qu'elles puissent se diviser indéfiniment et ainsi, d'obtenir après un certain nombre de passages, une culture pure. Des travaux ont déjà été effectués sur l'établissement de lignées de cellules endothéliales humaines et murines par la transformation de ces cellules à l'aide de rétrovirus ou d'adénovirus. Ce procédé a permis l'expression de protéines stimulant constitutivement le cycle cellulaire afin de les rendre « immortelles ». Ces protéines sont l'oncogène N-ras, la sous-unité catalytique de la télomérase et la grande ou la moyenne protéine T du virus SV40. Ainsi, les cellules sont indéfiniment divisibles sans perte du phénotype endothélial (Balconi, Spagnuolo et al. 2000; MacKenzie, Franco et al. 2002; Matsumura, Takesue et al. 2004; Roux and Couraud 2005).

L'immortalisation de cellules endothéliales selon cette technique requière deux éléments indispensables :

- Un vecteur rétroviral contenant des séquences codantes pour une protéine stimulatrice du cycle cellulaire, mais aussi des séquences lui permettant d'être produit en masse.
- Des cellules contenant le vecteur rétroviral et servant de support à la production en masse de particules rétrovirales infectieuses.

Le vecteur rétroviral

L'utilisation de vecteurs rétroviraux pour l'introduction et l'expression efficace de protéines stimulatrices du cycle cellulaire, comme la protéine mT, dans des embryons et différents types cellulaires chez la souris adulte a déjà été effectuée avec succès (Williams, Courtneidge et al. 1988). L'utilisation de vecteurs provenant de génomes rétroviraux est justifiée par le fait que les rétrovirus représentent un moyen efficace et modulable pour l'introduction de gènes dans un grand nombre de types cellulaires différents *in vivo* et *in vitro*.

L'équipe du Professeur Dejana à Milan, ainsi que d'autres équipes scientifiques, ont utilisé avec succès ce procédé pour immortaliser des cellules endothéliales en culture, provenant de souris, sans perte du phénotype endothélial et de l'inhibition de contact (Williams, Courtneidge et al. 1988; Bussolino, De Rossi et al. 1991; Mantovani, Bussolino et al. 1992; Garlanda, Parravicini et al. 1994; Balconi, Spagnuolo et al. 2000). Le vecteur rétroviral utilisé dans ces études est représenté en **figure 30**.

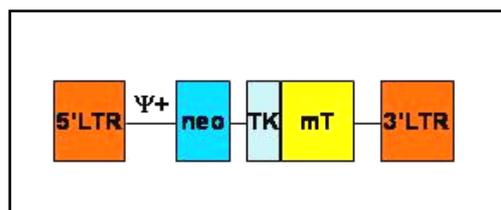


Figure 30: Structure du vecteur rétroviral N-TKmT.

ψ+=signal d'encapsidation ; neo=gène de résistance à la néomycine ; TK=gène codant pour la thymidine kinase ; mT=gène codant pour la protéine mT ; LTR= longues séquences répétées.

Sa structure est la suivante :

- Une séquence « signal » ψ+ qui lui permet d'être encapsidé, c'est-à-dire, inclus dans une particule virale.

- Le gène codant pour la protéine mT qui lui permet de stimuler le cycle cellulaire ; ce gène est sous le contrôle du promoteur codant pour la thymidine kinase.
- De longues séquences répétées LTR en 5' et 3' ; elles jouent un rôle de promoteur de la transcription et sont nécessaires à l'intégration du vecteur dans l'ADN de la cellule infectée.

Les cellules d'empaquetage

Afin d'incorporer ce vecteur dans des cellules, il est nécessaire de posséder des virus infectieux. La production de ces virus est réalisée à l'aide de cellules dites « d'empaquetage ». Dans le cas des travaux effectués par l'équipe du Professeur Dejana, les particules rétrovirales contenant le vecteur N-TKmT ont été obtenues par des cellules nommées GgP+E (**figure 31**). Ces cellules sont initialement des fibroblastes NIH 3T3 qui ont reçu, par électroporation, trois plasmides différents : un contenant le vecteur rétroviral, un autre contenant les séquences *gag* et *pol*, et le dernier contenant la séquence *env* (Markowitz, Goff et al. 1988). Ces séquences *gag*, *pol* et *env* permettent la synthèse de ces protéines qui jouent un rôle majeur dans la production (*gag*) et l'empaquetage (*gag*, *env*) de particules rétrovirales, ainsi que dans l'infection puis l'intégration (*pol*) du vecteur rétroviral dans le génome de la cellule infectée (Freed and Mouland 2006). La séparation de ces trois gènes sur deux plasmides permet d'éviter qu'une recombinaison entre le vecteur N-TKmT et un vecteur contenant les trois gènes ensemble, génère des particules rétrovirales possédant le moyen de se répliquer de façon autonome. En effet, des rétrovirus contenant le vecteur N-TKmT et les séquences *gag*, *pol* et *env* seraient très dangereux à manipuler.

La culture de ces cellules permet ainsi la production en masse, dans le surnageant de culture, de particules rétrovirales contenant le vecteur et capables d'infecter des cellules. L'infection permet l'insertion du vecteur dans le génome cellulaire, puis la synthèse de la protéine mT. Cette protéine possède un site d'ancrage dans la membrane plasmique et des sites d'interaction et d'activation de protéines impliquées dans le contrôle de la régulation du cycle cellulaire : PI3-K, PLC γ 1, la protéine phosphatase 2A (PP2A), pp60^{c-src} et pp62^{c-yes} (Ichaso and Dilworth 2001). La protéine mT est exprimée dans toutes les cellules infectées mais, c'est uniquement dans les cellules endothéliales, que son interaction avec les protéines régulant le cycle cellulaire induit leur transformation (Williams, Courtneidge et al. 1988). Les cellules endothéliales ainsi transformées, colonisent entièrement le support de culture au détriment des cellules contaminantes ce qui, après une quinzaine de passages, génère une population endothéliale pure.

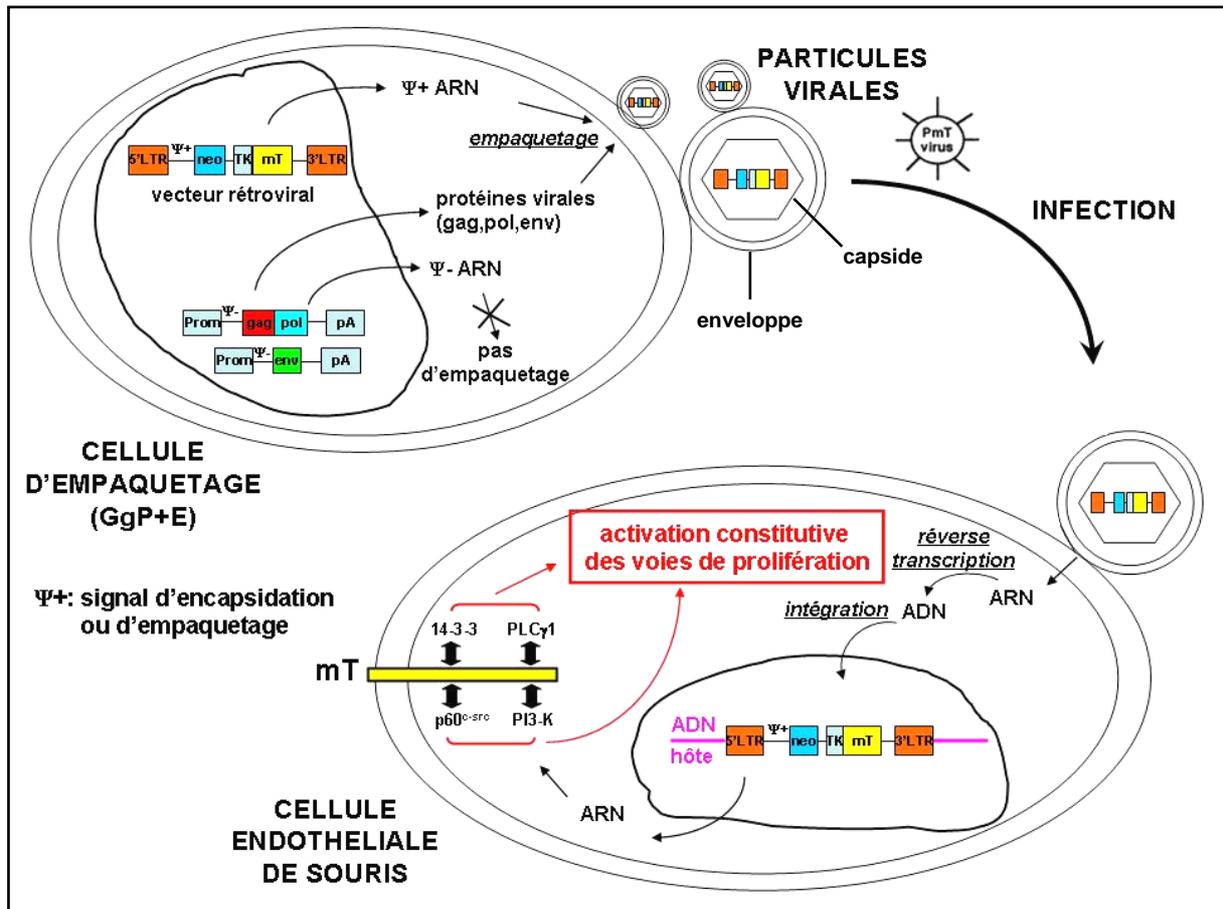


Figure 31: Schéma récapitulatif de la formation des particules rétrovirales et de l'immortalisation des cellules endothéliales de souris.

Les cellules d'empaquetage GgP+E forment des particules rétrovirales contenant le vecteur N-TKmT qui « immortalise » spécifiquement les cellules endothéliales de souris.

Isolement et mise en culture de cellules endothéliales de poumons et de cœurs de souris

Quatre souris de chaque génotype (normales et KO P2Y₁) sont euthanasiées par inhalation de CO₂, puis les poumons et les cœurs sont prélevés, lavés dans une solution de PBS-PSG-fungizone, découpés en petits morceaux à l'aide de ciseaux et enfin, incubés sous agitation dans une solution de DMEM (Invitrogen) contenant de la collagénase A (Roche) et de la DNase I (Amersham Biosciences) (1,5 mg/mL et 25 µg/mL, respectivement) pendant 4 heures à 37°C. La suspension cellulaire obtenue est ensuite filtrée sur un disque en nylon contenant des mailles de 100 µm de diamètre, puisensemencée dans une plaque de 24 puits (à raison de 3 x 10⁴ cellules par puit) dont la surface des puits a été préalablement adsorbée par une solution de gélatine 0,1% (Sigma Aldrich).

Immortalisation des cellules endothéliales en culture

Les cellules ainsi isolées sont cultivées pendant 2 jours dans un milieu de culture complet pour cellules endothéliales comprenant du DMEM, 20% de sérum de veau fœtal, 100 U/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 0,3 mg/mL glutamine, 2 µg/mL fungizone, 50 µg/mL d'extrait de glande pituitaire de cerveau bovin (ECGS) (BD Biosciences) et 100 µg/mL d'héparine (Sigma Aldrich). Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 heures avec du surnageant de culture des cellules d'emballage GgP+E (500 µL par puit) en présence de 8 µg/mL de polybrène (Sigma Aldrich). Ce surnageant contient les particules rétrovirales renfermant le vecteur N-TKmT. Les cellules d'emballage GgP+E (gracieusement fournies par Madame le Professeur E. Dejana, Milan) sont cultivées en présence de DMEM supplémenté de 15% SVF et de PSG. Une seconde infection virale des cellules endothéliales est réalisée le lendemain. Les cellules sont ensuite cultivées dans du milieu de culture complet jusqu'à confluence des puits, puisensemencées dans une boîte de culture T25 recouverte de gélatine 0,1%.

Cytométrie de flux

Les cellules endothéliales, en culture dans des boîtes T25, sont détachées par un traitement à l'EDTA 5mM, puis resuspendues dans un tampon PBS-BSA 0,1%-NaN₃ 0,2%. Elles sont ensuite incubées pendant 30 min à +4°C en présence de 20 µg/mL d'isolectine B₄ (Coger) ou de 10 µg/mL des anticorps monoclonaux couplés FITC suivants : rat anti-souris PECAM-1 (MEC 13.3), anti-ICAM-2 (3C4), anti-VCAM-1 (429), anti-ICAM-1 (3E2) et anti-

P-sélectine (RB40.34) (BD Biosciences). Cinq ou dix mille cellules sont analysées à l'aide d'un cytomètre de flux (BD Biosciences) et le pourcentage de cellules positives et l'intensité de fluorescence moyenne (IFM) sont déterminés.

Pour les expériences de stimulation au TNF α , les cellules endothéliales sont ensemencées la veille de l'expérience dans des boîtes de 6 puits recouvertes de gélatine 0,1%, à raison de 6×10^5 cellules par puits, en présence de milieu de culture DMEM contenant 10% SVF et supplémenté ou non de 10 ng/mL de TNF α (Sigma Aldrich). Après 7 ou 24 heures de stimulation, les cellules sont lavées en PBS, puis détachées par un traitement à l'EDTA 5 mM et enfin analysées par cytométrie de flux.

Immunomarquage des cellules endothéliales en culture

Les cellules endothéliales sont ensemencées dans des puits de culture montés sur une lame de microscope (8 puits au total par lame) préalablement recouverts de gélatine 0,1%. A confluence, les cellules sont fixées par une solution d'acétone à -20°C, perméabilisées par un tampon PBS-0,05% saponine, puis incubées successivement avec une solution de PBS-0,2% BSA ou du PBS-1% SVF (marquages fvW et PECAM-1, respectivement) et les anticorps primaires suivants : un anticorps polyclonal de lapin anti-fvW humain (15,5 μ g/mL) (Dako) et un anticorps monoclonal de rat anti-souris PECAM-1 (1,2 μ g/mL) (BD Biosciences). Un anticorps secondaire anti-espèce et couplé FITC est ensuite ajouté puis, une lamelle est montée sur la lame de microscope, après avoir préalablement déposé quelques gouttes d'une solution de montage contenant du DAPI pour permettre la visualisation des noyaux cellulaires. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence et les images sont obtenues à l'aide d'une caméra couplée à un ordinateur.

Mesure des variations de la concentration intracellulaire de Ca²⁺

Les cellules endothéliales sont ensemencées sur des lamelles de microscope de dimension 27×12 mm recouvertes de gélatine 0,1%. Les lamelles sont déposées chacune dans un puit d'une plaque de 6 puits contenant du DMEM supplémenté de 10% SVF et de 0,2 U/mL d'apyrase afin d'éliminer les traces de nucléotides présents dans le milieu de culture. A confluence, les lamelles sont transférées dans des nouvelles plaques de 6 puits contenant, par puit, 1 mL de BSS supplémenté de 5 μ M Fura-2/AM et ceci pendant 30 min, à +37°C et à l'obscurité. Les lamelles sont ensuite rincées dans une solution de BSS, puis transférées dans des cuvettes en plastique de 10×10 mm maintenues à +37°C dans un spectrofluoromètre et contenant 1 mL d'une solution de BSS, 0,2% HSA et 0,2 U/mL d'apyrase. La longueur

d'excitation est alternativement de 340 ou 380 nm et l'émission de fluorescence est établie à 510 nm.

Mesure de la prolifération des cellules endothéliales en culture

Les cellules endothéliales sontensemencées la veille de l'expérience dans des boîtes de 6 puits recouvertes de gélatine 0,1%, à raison de 1,5 ou 3 x 10⁵ cellules par puit dans du DMEM seul. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par une solution de DMEM-10% SVF-PSG supplémenté ou non d'un antagoniste spécifique du récepteur P2Y₁, le MRS 2179 (100 ou 500 µM) (Tocris). Après 24, 48, 72 ou 96 heures, les puits sont rincés avec du PBS et les cellules endothéliales sont détachées à l'aide d'une solution de Trypsine-EDTA. Les puits sont rincés trois fois avec du DMEM afin de recueillir toutes les cellules présentes dans les puits ; un contrôle est effectué au microscope. Le nombre total de cellules par puit est déterminé après la coloration au bleu de Trypan et le comptage manuel à l'aide d'un hémocytomètre (Tolnai 1975).

Western blot

Les cellules endothéliales sontensemencées la veille de l'expérience dans des boîtes de culture de 100 mm de diamètre, recouvertes de gélatine 0,1%, à raison de 3,4 x 10⁶ cellules par boîte. Les cellules sont incubées dans une solution de DMEM avec 10% SVF, supplémenté ou non de TNFα (10 ng/mL). Elles sont ensuite rincées, détachées avec de l'EDTA 5 mM, puis centrifugées à 300g à +4°C pendant 6 min et enfin, resuspendues dans un tampon de lyse Tris-HCl, 1% Triton et contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). La quantité totale de protéines contenues dans le lysat est déterminée à l'aide d'un kit BCA (Pierce). Vingt cinq microgrammes de protéines sont déposés sur un gel de 7% d'acrylamide contenant 1% de SDS puis, transférés sur une membrane de PVDF (Millipore). La membrane est saturée pendant 1 heure dans un tampon TBS-Tween 0,1% contenant 5% de lait, puis incubée durant une nuit à +4°C en présence des anticorps polyclonaux suivants : chèvre anti-souris VCAM-1 et chèvre anti-souris ICAM-1 (R&D Systems), à une concentration de 0,1 µg/mL dans du TBS-Tween 0.1%-1% lait. Après lavages, les membranes sont incubées avec un anticorps de lapin anti-chèvre couplé HRP (1/20 000^e) pendant 1 heure, puis révélées à l'aide d'un kit ECL (Amersham Biosciences). Afin de vérifier qu'une même quantité de protéines a été déposée dans chaque bande de migration, les membranes ont été incubées avec une solution décapante (Pierce) et incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-β-actine (1,2 µg/mL) (Sigma Aldrich) suivi d'un anticorps de chèvre anti-souris

HRP (1/20 000^e). La quantité des protéines VCAM-1 et ICAM-1 révélées est analysée par la mesure de l'intensité des bandes correspondantes à l'aide d'un scanner couplé à un ordinateur.

Adhésion de monocytes U937 sur des cellules endothéliales en culture

Les cellules endothéliales ($2,5 \times 10^4$ cellules dans 100 μ L de DMEM-10% SVF) sont ensemencées la veille de l'expérience dans une plaque de 96 puits dont les puits sont préalablement recouverts de gélatine 0,1%. La stimulation par du TNF α est effectuée comme cité précédemment. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu de culture RPMI 1640 (Invitrogen) contenant 1% SVF, puis une solution de monocytes humains U937 est ajoutée (5×10^4 cellules dans 100 μ L de RPMI 1640-1% SVF, par puit) pendant 30 min à +37°C, avec une légère agitation. Les monocytes non-adhérents sont éliminés par des lavages successifs, puis 100 μ L d'une solution de PFA 3% sont déposés par puit, pendant 30 min à température ambiante. Le nombre total de monocytes adhérents aux cellules endothéliales est déterminé après avoir photographié numériquement 6 à 10 champs différents par puit, suivi d'un comptage à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image. Les monocytes humains U937 (fournis par Monsieur de La Salle, Inserm U.725, Strasbourg) sont cultivés dans une solution de RPMI 1640 supplémenté de 10% SVF et de PSG.

Statistiques

Les résultats représentent la moyenne \pm SEM obtenue à partir d'au moins trois expériences. Les résultats obtenus ont été analysés en utilisant le test t de Student afin de pouvoir comparer statistiquement les moyennes de deux groupes. Les différences ont été jugées significatives quand la valeur de P est inférieure à 0,05.

1. Développement et caractérisation de cellules endothéliales immortalisées de poumons et de cœurs de souris témoins et KO P2Y₁

L'utilisation des particules virales, obtenues par la culture des cellules d'empaquetage GgP+E, a permis d'établir quatre lignées de cellules endothéliales immortalisées de souris : deux lignées de souris normales (témoin) et deux autres de souris KO P2Y₁. Pour chaque génotype, une lignée provenant de poumons et une provenant de cœurs ont été établies. La **figure 32** est un schéma récapitulatif des différentes étapes du protocole d'immortalisation.

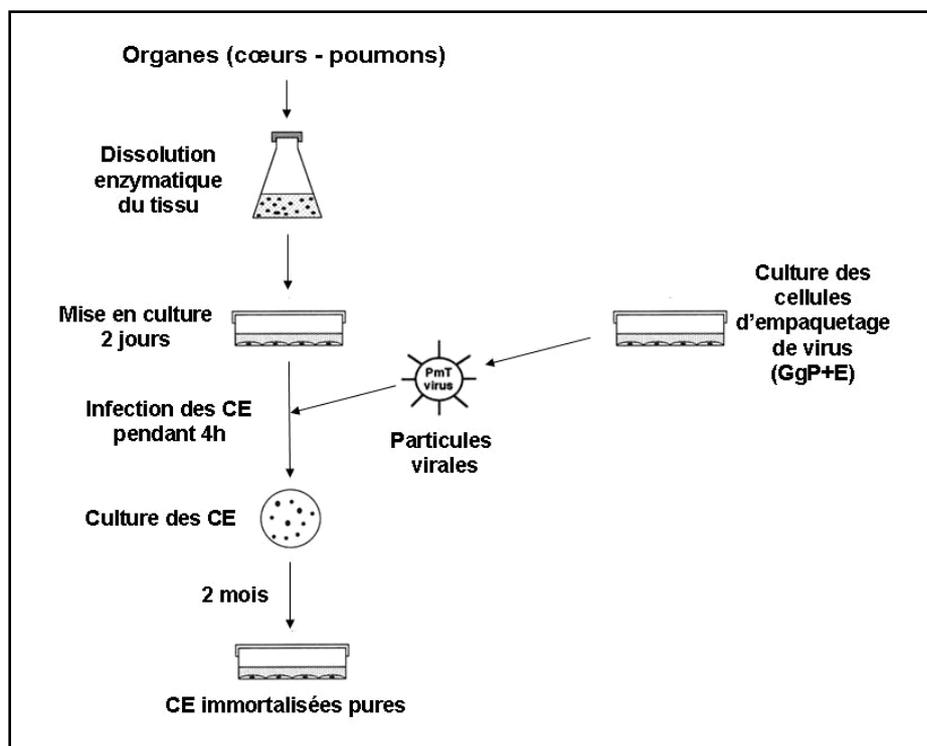


Figure 32: Schéma récapitulatif des principales étapes du protocole d'immortalisation de cellules endothéliales de souris en culture par un rétrovirus. D'après et adapté de (Balconi, Spagnuolo et coll., 2000). La culture des cellules d'empaquetage GgP+E permet d'obtenir, dans le surnageant de culture, des particules rétrovirales contenant le vecteur N-TKmT. Une fois récoltées, ces particules rétrovirales sont mises en contact avec les cellules endothéliales préalablement isolées de poumons ou de cœurs de souris. L'insertion du gène codant pour la protéine mT et son expression dans la cellule endothéliale permet l'activation constitutive des protéines impliquées dans le contrôle de la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, la cellule endothéliale colonise le support de culture au détriment des fibroblastes ou des cellules musculaires lisses par exemple. CE = cellules endothéliales.

Après l'immortalisation des cellules endothéliales en culture par les particules rétrovirales, deux mois de culture, représentant une quinzaine de passages, ont été nécessaires

à l'obtention des lignées. A confluence, ces cellules présentent la caractéristique d'avoir un aspect pavimenteux (**figure 33A**) mais de forme plus allongée que celle des HUVEC en culture (**figure 14, page 56**), et de se présenter sous forme d'une monocouche cellulaire sans superposition de cellules (**figure 33A**). L'ensemble de ces observations est en accord avec ce qui a déjà été décrit lors de l'utilisation de cette technique d'immortalisation (Bussolino, De Rossi et al. 1991; Garlanda, Parravicini et al. 1994; Balconi, Spagnuolo et al. 2000).

Afin d'identifier les cellules et de déterminer la pureté de la culture, les cellules ont été marquées par des anticorps dirigés contre des marqueurs de surface endothéliaux et analysées en cytométrie de flux. Les cellules provenant de poumons de souris témoins et de souris KO P2Y₁ sont à environ 90% positives pour les molécules PECAM-1 et ICAM-2, et à 98% positives pour l'isolectine B₄ (**figure 33B**). Concernant les cellules issues de cœurs, les données sont identiques (non montré). Dans la mesure où les molécules PECAM-1 et ICAM-2 sont exprimées constitutivement par les cellules endothéliales et que l'isolectine B₄ est un marqueur sélectif de ces cellules, les données de cytométrie suggèrent que les lignées cellulaires établies présentent un phénotype endothélial. De plus, ces cellules expriment à leur surface d'autres molécules endothéliales telles que VCAM-1, ICAM-1 et P-sélectine dont l'expression n'est pas constitutive, mais dépendante de l'état d'activation cellulaire (**figure 33B**).

Nous avons confirmé le caractère endothélial des lignées cellulaires obtenues par des expériences d'immunomarquage du fvW sur les cellules en culture. Hormis son expression dans les mégacaryocytes et dans les plaquettes sanguines, le facteur de fvW est spécifiquement exprimé dans les cellules endothéliales. La **figure 34** met en évidence un marquage intense du fvW mais qui ne concerne que la moitié des cellules. Cette observation a déjà été décrite dans différentes études sur des cellules endothéliales immortalisées de souris dont celle de Bussolino et coll. où seulement 20 à 50% des cellules endothéliales étaient positives pour ce marqueur (Bussolino, De Rossi et al. 1991). En parallèle, ces cellules ont également été marquées à l'aide d'un anticorps anti-PECAM-1. Le marquage est intense et concerne toutes les cellules (**figure 35A**). L'agrandissement en **figure 35B** permet de localiser le marquage tout autour des cellules en accord avec la localisation membranaire de cette molécule (Newman 1997).

Nous nous sommes ensuite intéressés à identifier les récepteurs P2Y exprimés par ces cellules. A cause de l'absence d'anticorps efficaces dirigés contre ces récepteurs, des expériences de mesures de mouvements calciques intracellulaires ont été effectuées. Pour cela, des cellules endothéliales, préalablement marquées au Fura-2/AM, ont été stimulées par

différents agonistes de ces récepteurs (ADP, ATP, UTP, UDP) et les signaux de fluorescence ont été enregistrés. La stimulation des cellules endothéliales témoins (de poumons et de cœurs) par de l'ADP induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et cette réponse est inhibée en présence de l'antagoniste sélectif du récepteur P2Y₁, le MRS2179 (**figure 36A**). Cette réponse est désensibilisable car une seconde stimulation à l'ADP n'entraîne pas d'augmentation du signal de fluorescence. Par contre, les cellules endothéliales de souris KO P2Y₁ ne répondent pas à l'ADP (**figure 36C**), mais leur réponse à l'ATP et l'UTP n'est pas modifiée (non montré). Ces données suggèrent que les cellules endothéliales témoins expriment au moins un récepteur à l'ADP, couplé à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, et que ce récepteur est absent sur les cellules endothéliales KO P2Y₁. La présence du récepteur P2Y₁ devra cependant être confirmée par des expériences de RT-PCR. La stimulation des cellules endothéliales, provenant des deux génotypes, par de l'ATP ou de l'UTP (**figure 36B**) induit une augmentation du signal de fluorescence, désensibilisable, suggérant la présence de récepteurs à l'ATP et à l'UTP couplés à une augmentation de la concentration intracellulaire calcique ; les récepteurs P2Y₂ et P2Y₄ semblent être impliqués. Une réponse à l'UDP a également été observée suggérant la présence du récepteur P2Y₆ (non montré). L'absence actuelle d'antagonistes sélectifs des récepteurs P2Y₂, P2Y₄ et P2Y₆ ne permet pas de conclure sur leur présence réelle à la surface de ces cellules, mais des expériences de RT-PCR permettront de mettre en évidence, la présence ou non, d'ARNm codant pour ces récepteurs.

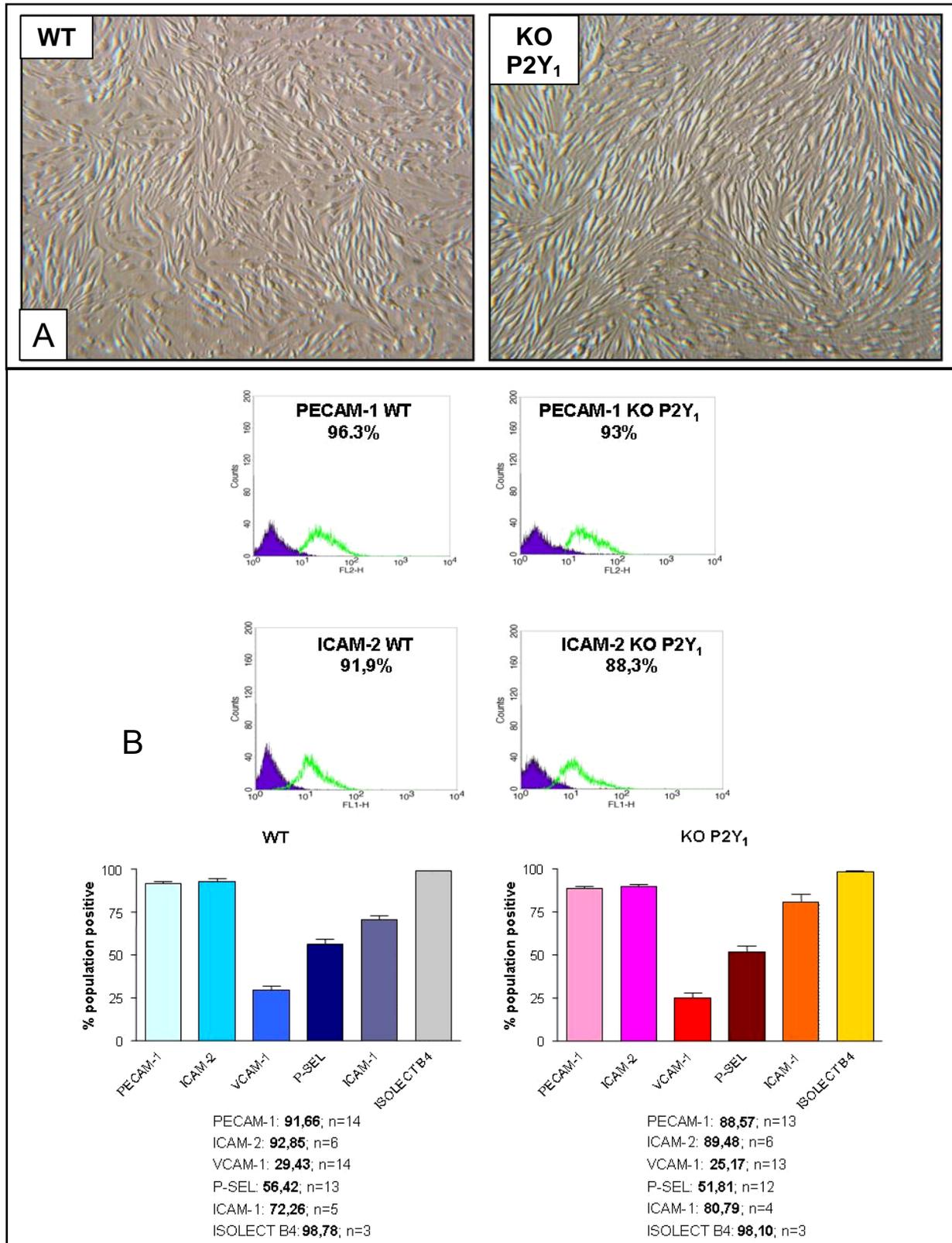


Figure 33: Caractérisation des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y₁. **A** : Photographies de cellules endothéliales de poumons en culture à confluence ; **B** : Analyses de l'expression de marqueurs endothéliaux après l'analyse des cellules endothéliales de poumons au cytomètre. Les cellules ont un aspect pavimenteux « allongé » en culture et elles expriment les marqueurs spécifiques de cellules endothéliales.

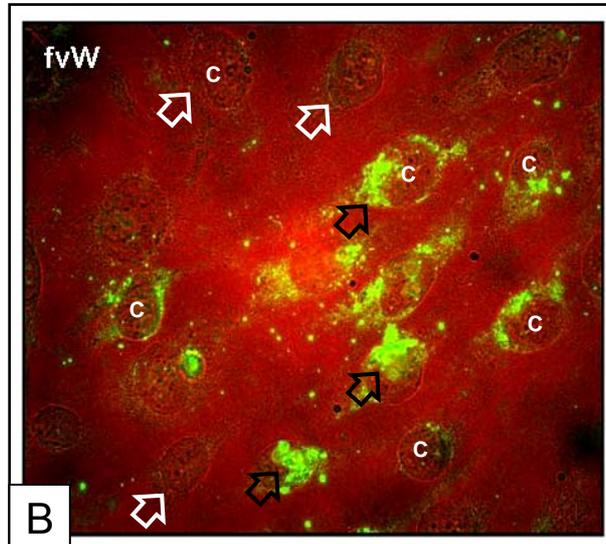
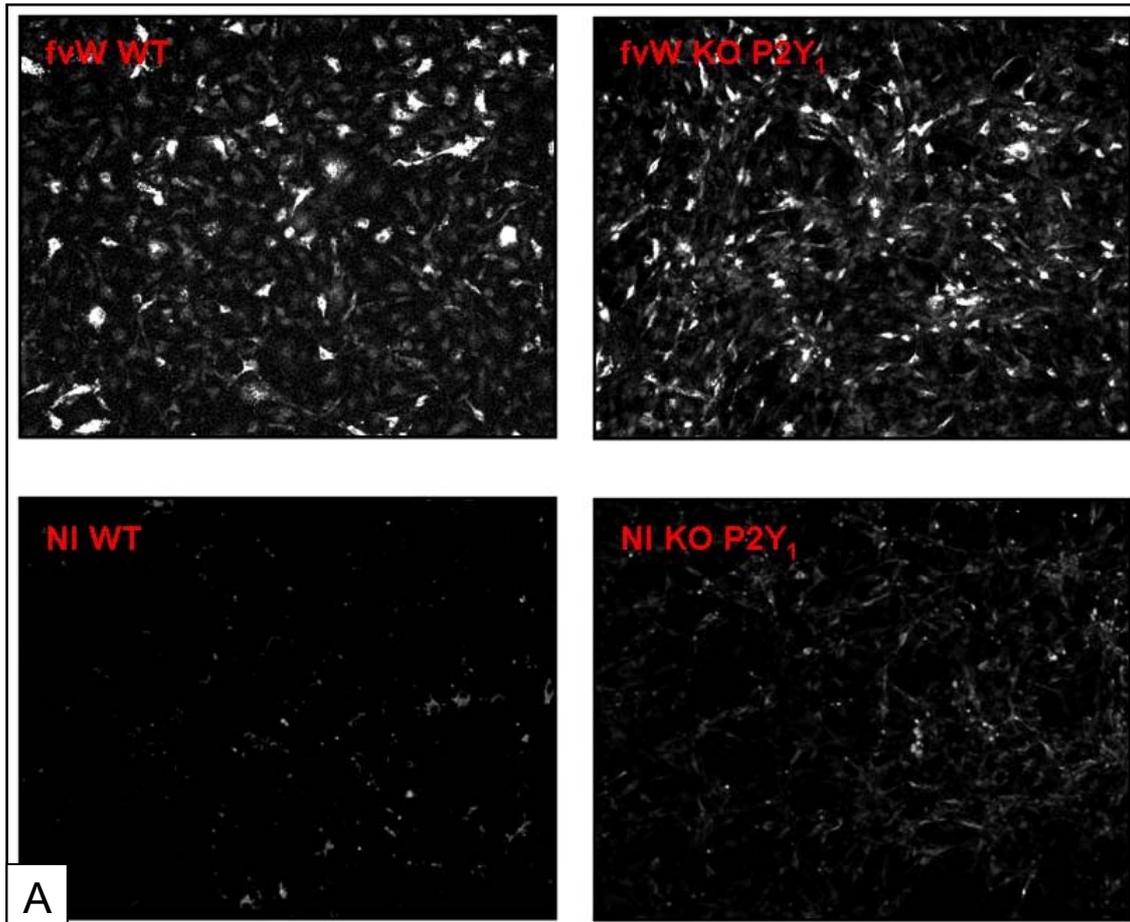


Figure 34: Immunomarquage du fvW sur des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y₁ en culture.

A : Marquage du fvW (en blanc) et marquage avec un anticorps non-immun (NI) sur des cellules endothéliales de poumons de souris témoins (à gauche) et KO P2Y₁ (à droite). **B :** Agrandissement du marquage du fvW (en vert) sur des cellules endothéliales (C) de poumons de souris témoins ; les flèches noires indiquent la présence intracellulaire de fvW et les flèches blanches indiquent des cellules qui ne sont pas marquées. Un filtre laissant passer la couleur rouge a été placé afin de mieux visualiser les cellules par rapport à la lumière blanche.

La moitié des cellules endothéliales en culture exprime le fvW.

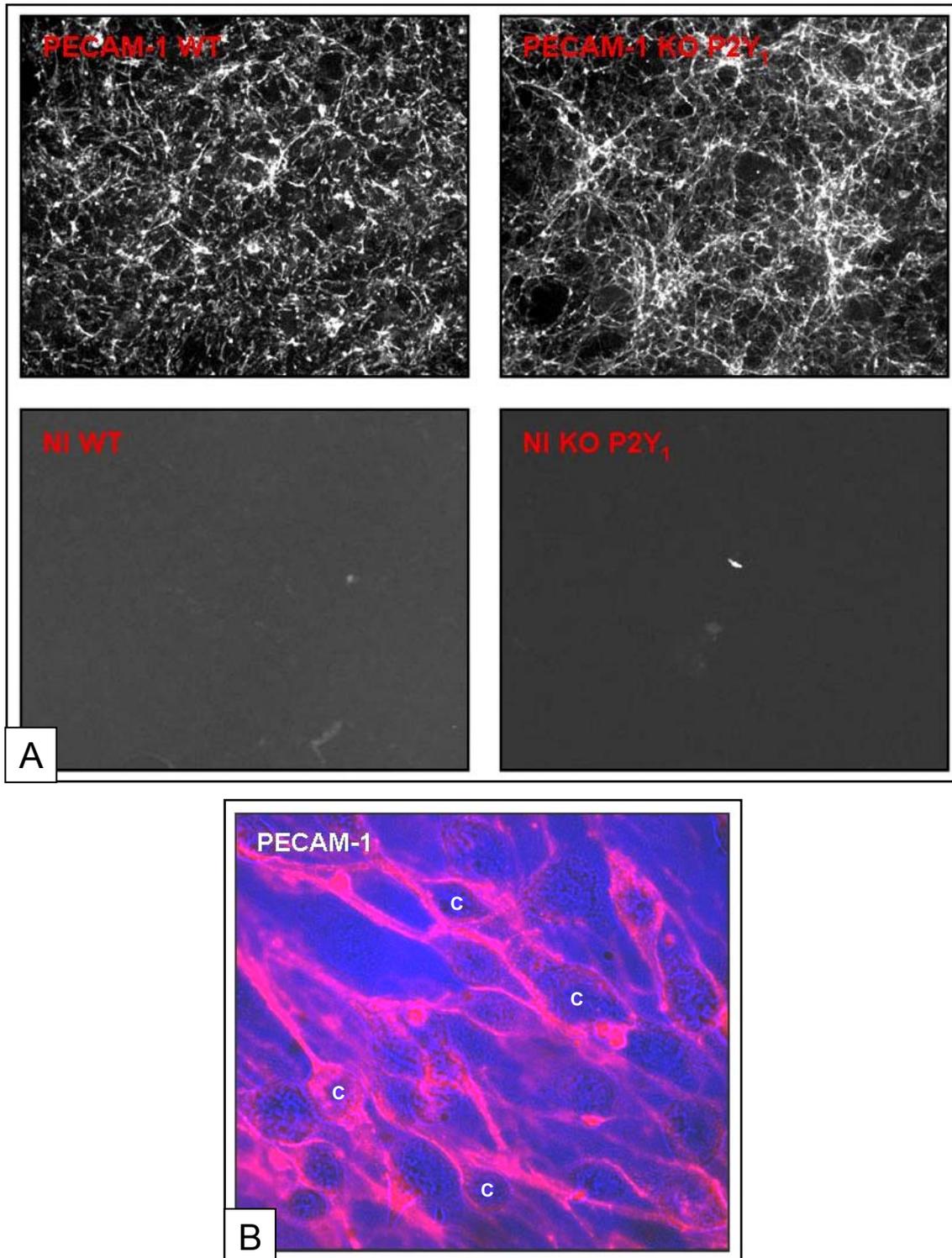


Figure 35 : Immunomarquage de la molécule PECAM-1 sur des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y₁ en culture.

A : Marquage de PECAM-1 (en blanc) et marquage avec un anticorps non-immun (NI) sur des cellules endothéliales de poumons de souris témoins (à gauche) et KO P2Y₁ (à droite). **B :** Agrandissement du marquage de PECAM-1 (en rose) sur des cellules endothéliales (C) de poumons de souris témoins. Un filtre laissant passer la couleur bleu a été placé afin de mieux visualiser les cellules par rapport à la lumière blanche.

Les cellules endothéliales en culture expriment la molécule PECAM-1.

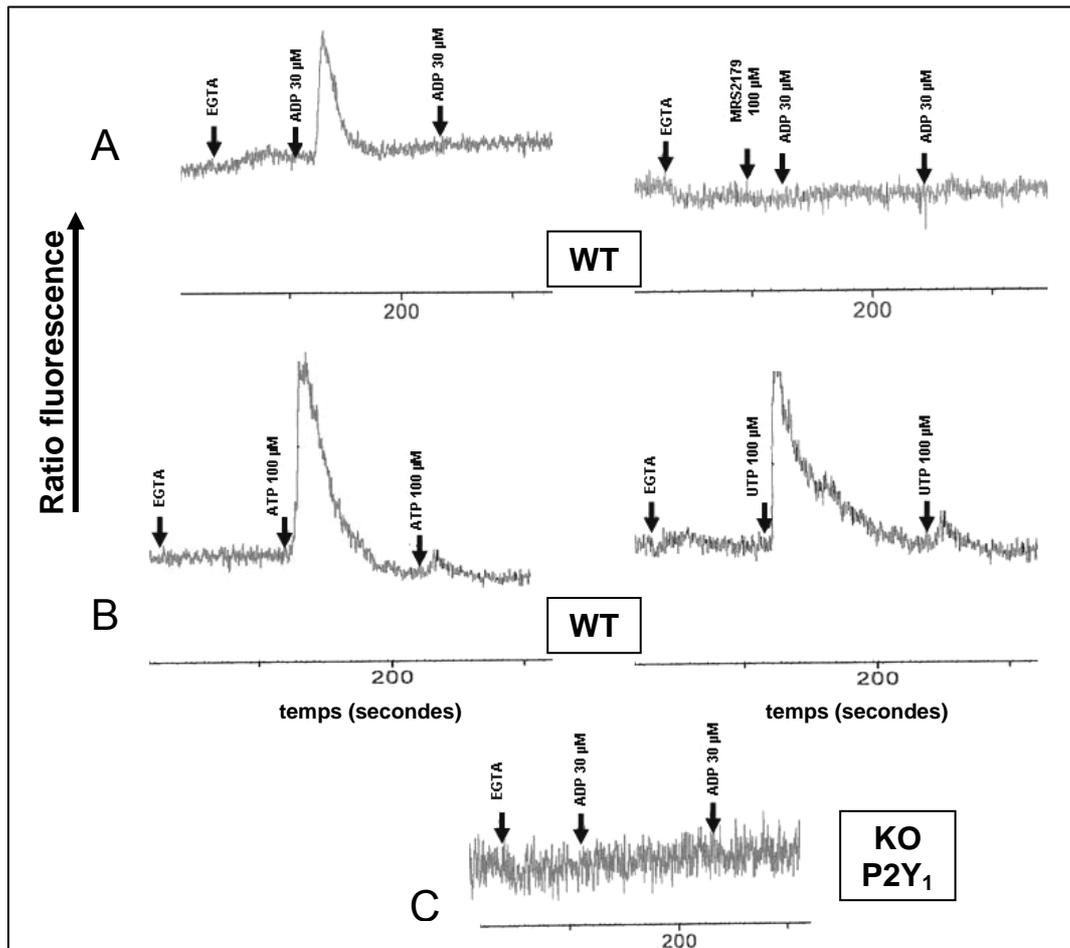


Figure 36: Tracés des variations intracellulaires de la concentration de Ca^{2+} dans les cellules endothéliales immortalisées de poumons de souris témoins (A-B) et de souris KO P2Y_1 (C) après stimulation par de l'ADP (A et C), de l'ATP et de l'UTP (B).

Les cellules endothéliales témoins répondent à des stimulations à l'ATP et à l'UTP et leur réponse à l'ADP est inhibée par le MRS2179. Les cellules endothéliales KO P2Y_1 ne répondent pas à l'ADP.

2. Rôle du récepteur P2Y₁ dans la prolifération des cellules endothéliales en culture

Après avoir identifié le récepteur P2Y₁ à la surface des lignées endothéliales, nous avons regardé si ce récepteur participe à la régulation de la cellule endothéliale. Dans la mesure où des travaux suggèrent que les nucléotides, sécrétés constitutivement par les cellules endothéliales durant leur culture, stimulent la prolifération (Rathbone, Middlemiss et al. 1992; Van Daele, Van Coevorden et al. 1992; Gendaszewska-Darmach, Maszewska et al. 2003), et que l'identification des récepteurs P2 impliqués dans ce processus n'a pas encore été établie, nous avons étudié le rôle du récepteur P2Y₁ dans la prolifération de ces cellules.

La transformation des cellules endothéliales par le procédé d'immortalisation peut certes biaiser l'interprétation de données concernant leur prolifération, mais leur croissance reste néanmoins sensible et modulable, soit par la délétion d'un gène (Pece-Barbara, Vera et al. 2005), soit pharmacologiquement (Cassoni, Marrocco et al. 2006). Ainsi, nous avons utilisé les cellules endothéliales immortalisées de cœurs et de poumons de souris témoins et KO P2Y₁ pour voir si l'absence d'expression du récepteur P2Y₁ pouvait affecter leur prolifération.

Les cellules ont étéensemencées à raison de 3×10^5 cellules par puit et leur nombre a été déterminé quotidiennement pendant quatre jours. La population des cellules endothéliales témoins a plus que doublé entre le 1^e et le 3^e jour (poumon : 5×10^5 cellules à J+1 et 12×10^5 cellules à J+3 ; cœur : $3,5 \times 10^5$ cellules à J+1 et 12×10^5 cellules à J+3) contrairement aux cellules endothéliales KO P2Y₁ où le doublement de la population a nécessité quatre jours (poumons : $4,2 \times 10^5$ cellules à J+1 et $7,5 \times 10^5$ cellules à J+4 ; cœurs : $2,7 \times 10^5$ cellules à J+1 et 6×10^5 cellules à J+4) (**figure 37**).

Afin de voir si cette différence de prolifération entre les cellules endothéliales de souris témoins et KO P2Y₁ est réellement la résultante de l'absence d'expression de ce récepteur chez les souris KO, les cellules ont été incubées, durant les quatre jours de l'expérience, en présence d'un antagoniste sélectif de ce récepteur, le MRS2179. Utilisé à la concentration de 100 μ M, il permet de bloquer la totalité des récepteurs P2Y₁ ainsi que les effets médiés par ce récepteur au niveau des plaquettes sanguines (Baurand and Gachet 2003). A cette concentration, le MRS2179 diminue le nombre de cellules comptabilisé chaque jour chez les cellules témoins (poumons et cœurs) alors qu'il ne le modifie pas chez les cellules KO P2Y₁ (**figure 37**). Une concentration de 500 μ M a été testée afin de prolonger l'effet

inhibiteur de ce composé, dans l'hypothèse où il serait dégradé par les cellules endothéliales durant les quatre jours d'expérience. Cette concentration permet, après trois jours, de diviser la population cellulaire par deux des cellules témoins (poumons à J+3 : $6,5 \times 10^5$ cellules avec 500 μM de MRS2179 contre 12×10^5 cellules ; cœurs à J+3 : $6,3 \times 10^5$ cellules avec 500 μM de MRS2179 contre 12×10^5 cellules) (**figure 37**). L'effet inhibiteur obtenu à cette concentration dans les cellules témoins est identique à celui observé lors de l'absence du récepteur dans les cellules KO. De plus, cette concentration n'affecte pas la prolifération des cellules endothéliales KO P2Y₁. Des expériences identiques ont été réalisées avec des cellulesensemencées à une concentration de $1,5 \times 10^5$ cellules par puit au lieu des 3×10^5 cellules et les résultats obtenus sont similaires (non montré).

L'ensemble de ces données suggère que le récepteur P2Y₁ est un des récepteurs P2Y contribuant à l'effet prolifératif des nucléotides sur les cellules endothéliales en culture. Cette observation complète ainsi l'étude de Cha et Hahn dans laquelle, le rôle des récepteurs P2Y dans la prolifération de cellules endothéliales bovines en culture a été mis en évidence (page 22). Cependant, ce rôle devra être confirmé dans des cellules endothéliales primaires non immortalisées (HUVEC, par exemple) et dans le modèle de mesure de l'incorporation de [³H]-thymidine. De plus, des expériences identiques, mais utilisant un antagoniste plus puissant du récepteur P2Y₁, le MRS2500 (Kunapuli, Ding et al. 2003; Cattaneo, Lecchi et al. 2004; Hechler, Nonne et al. 2006), permettront de confirmer un rôle de ce récepteur dans la prolifération de ces cellules en culture. Il sera également intéressant d'évaluer l'implication d'autres récepteurs P2Y dans ce processus.

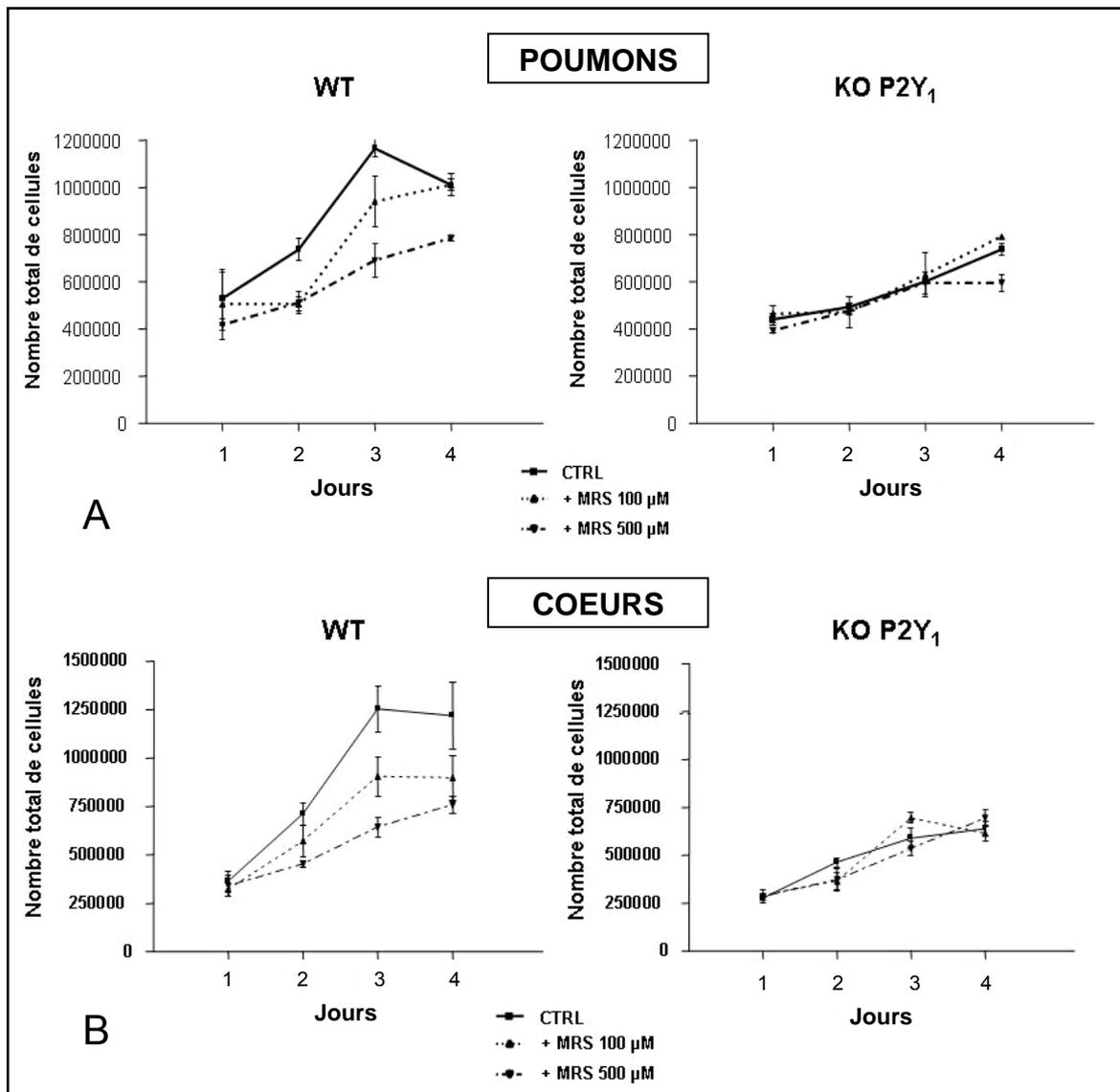


Figure 37 : Prolifération des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y₁ en culture pendant 4 jours.

Prolifération des cellules endothéliales de poumons (A) et de cœurs (B) de souris témoins et de souris KO P2Y₁ en présence ou non de MRS2179, un antagoniste sélectif du récepteur P2Y₁; n=4.

L'absence du récepteur P2Y₁ ou son blocage par le MRS2179 réduit la prolifération des cellules endothéliales en culture.

3. Analyse de l'expression des molécules ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales de souris témoins et KO P2Y₁

Comme décrit en pages 48-50, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion comme PECAM-1 et ICAM-2 indépendamment de leur état d'activation. D'autres molécules adhésives telles qu'ICAM-1 et VCAM-1 ont une expression augmentée suite à l'activation des cellules endothéliales. L'augmentation de la synthèse et l'exposition de ces molécules à la surface cellulaire sont des fonctions importantes de la cellule endothéliale car elles permettent le recrutement des cellules sanguines circulantes au niveau de l'endothélium et leur transmigration dans les tissus sous-endothéliaux dans un contexte inflammatoire par exemple. Afin de poursuivre l'étude du rôle du récepteur P2Y₁ dans la cellule endothéliale, nous avons analysé la capacité de ce récepteur à induire l'exposition de molécules adhésives. Cette étude est également justifiée par le fait qu'il a été démontré que le récepteur P2Y₂ est impliqué dans l'augmentation de l'expression et de l'exposition de la molécule VCAM-1 dans des cellules endothéliales humaines (Seye, Yu et al. 2003).

Les cellules endothéliales en culture ont été activées par du TNF α (10 ng/mL) pendant 7 ou 24 heures car ces conditions permettent l'augmentation de la synthèse et de la localisation des molécules adhésives de type ICAM-1 et VCAM-1 à la surface cellulaire (Hubbard and Rothlein 2000; Kevil, Patel et al. 2001; Engelhardt and Wolburg 2004). Après les 7 ou 24 heures de stimulation, la quantité des molécules présentes à la surface cellulaire a été déterminée par cytométrie de flux. En réponse au TNF α , les cellules endothéliales de poumons et de cœurs KO P2Y₁ exposent davantage de molécules ICAM-1 à leur surface que les cellules témoins respectives (**figures 38A et C**). De plus, le pourcentage d'augmentation de l'expression d'ICAM-1 chez les cellules endothéliales KO P2Y₁, entre l'état activé et non activé, est plus important que celui des cellules témoins (**figures 38B et D**). Ces données suggèrent que l'absence de récepteurs P2Y₁ dans ces cellules est liée à un plus grand nombre de molécules ICAM-1 exprimées à leur surface en réponse au TNF α .

Concernant la molécule VCAM-1, la quantité exprimée par les cellules KO P2Y₁ stimulées au TNF α est très légèrement inférieure à celle des cellules témoins (**figures 39A et C**), alors que le pourcentage d'augmentation n'est pas vraiment modifié (**figures 39B et D**). Cependant, une diminution un peu plus importante est à noter dans les cellules endothéliales de poumons KO P2Y₁ stimulées pendant 24 heures au TNF α (**figures 39A et B**).

Globalement, la différence d'expression de la molécule VCAM-1 entre les deux génotypes et après stimulation au TNF α est plus faible que celle observée pour la molécule ICAM-1.

Afin de confirmer les résultats obtenus par cytométrie de flux, des expériences de Western blot ont été réalisées avec ces cellules dans les mêmes conditions. En **figure 40**, le profil des bandes ICAM-1 obtenues, ainsi que les valeurs du ratio d'intensité des bandes ICAM-1/ β -actine, suggèrent que les cellules endothéliales de poumons et de cœurs KO P2Y₁ expriment plus de molécules ICAM-1 que les cellules témoins, indépendamment de l'état activé ou non. Pour la molécule VCAM-1, le profil des bandes montre l'absence de différence d'expression entre les deux génotypes (**figure 40**). Les résultats des expériences de Western blot confortent les données obtenues en cytométrie de flux.

ICAM-1 est une molécule d'adhésion qui participe au recrutement des monocytes et des lymphocytes T circulants à la surface des cellules endothéliales lors d'une inflammation (Engelhardt and Wolburg 2004). Il a donc été intéressant de regarder si la plus grande quantité de molécule ICAM-1 exprimée à la surface des cellules endothéliales KO P2Y₁ avait une répercussion sur la liaison de monocytes. Ceci a été réalisé à l'aide d'un modèle d'adhésion de monocytes humains (U937) sur des cellules endothéliales en culture, dans lequel l'implication de la molécule ICAM-1 est connue (Kevil, Patel et al. 2001). Après l'incubation des cellules endothéliales de poumons en présence des monocytes, les cellules KO P2Y₁ lient trois fois moins de monocytes que les cellules témoins à l'état basal (47 \pm 12 pour les cellules témoins et 14 \pm 6 pour les cellules KO). Ce résultat est surprenant dans la mesure où les cellules KO P2Y₁ non stimulées expriment plus de molécules ICAM-1 et que dans ce cas, on s'attendrait à un nombre plus important de monocytes adhérents par rapport aux cellules témoins. Après la stimulation au TNF α , les cellules KO P2Y₁ présentent environ 40% de monocytes de plus à leur surface par rapport aux cellules témoins (75 \pm 17 pour les cellules témoins et 107 \pm 20 pour les cellules KO) (**figure 41A**), ce qui semble aller dans le même sens que l'expression plus importante de molécules ICAM-1 dans ces cellules par rapport aux cellules témoins, en réponse au TNF α .

Concernant les cellules endothéliales de cœurs, la liaison de monocytes à leur surface est inexistante à l'état non stimulé (**figure 41B**) contrairement aux cellules de poumons (**figure 41A**). Suite à leur activation au TNF α , les cellules de cœurs des deux génotypes présentent le même nombre de monocytes liés à leur surface (**figure 41B**). Ces données d'adhésion pour les cellules de cœurs ne semblent pas illustrer les différences d'expression de la molécule ICAM-1 observées en cytométrie et en Western blot entre les cellules témoins et les KO P2Y₁.

Ainsi, les différences observées dans l'adhésion de monocytes pour les cellules de poumons, entre les deux génotypes, ne se retrouvent pas dans les cellules issues de cœurs. A ce stade, deux conclusions peuvent être formulées :

- les cellules endothéliales isolées de poumons et de cœurs présentent des résultats similaires en cytométrie de flux et en Western blot, mais différents dans le modèle d'adhésion de monocytes. Ceci illustre que des cellules endothéliales issues de tissus différents présentent des variations dans leur réponse.

- l'absence de récepteurs P2Y₁ ne semble pas avoir de conséquences majeures sur la capacité des cellules endothéliales à exprimer les molécules ICAM-1 et VCAM-1 et à lier des monocytes humains.

Cependant, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour comprendre pourquoi l'expression plus importante de la molécule ICAM-1 dans les cellules endothéliales KO P2Y₁ non stimulées ne se traduit pas par une augmentation du nombre de monocytes liés en surface par rapport aux cellules témoins. C'est pourquoi, il est envisagé de tester une autre lignée monocyttaire, les cellules THP-1 par exemple, ou d'utiliser des monocytes isolés de sang humain ou de souris. Enfin, concernant le rôle joué par le récepteur P2Y₁ dans l'exposition de ces molécules adhésives, il sera intéressant d'étudier la capacité de ces cellules à exposer VCAM-1, ICAM-1 et d'autres molécules adhésives comme la P-sélectine en réponse à d'autres stimuli tels que le LPS, les interleukines, la thrombine et les nucléotides (ADP, ATP, UTP et UDP). Des expériences de RT-PCR quantitative, pour mesurer la quantité d'ARNm codant pour ces molécules, permettront d'affiner les données obtenues par cytométrie de flux et Western blot.

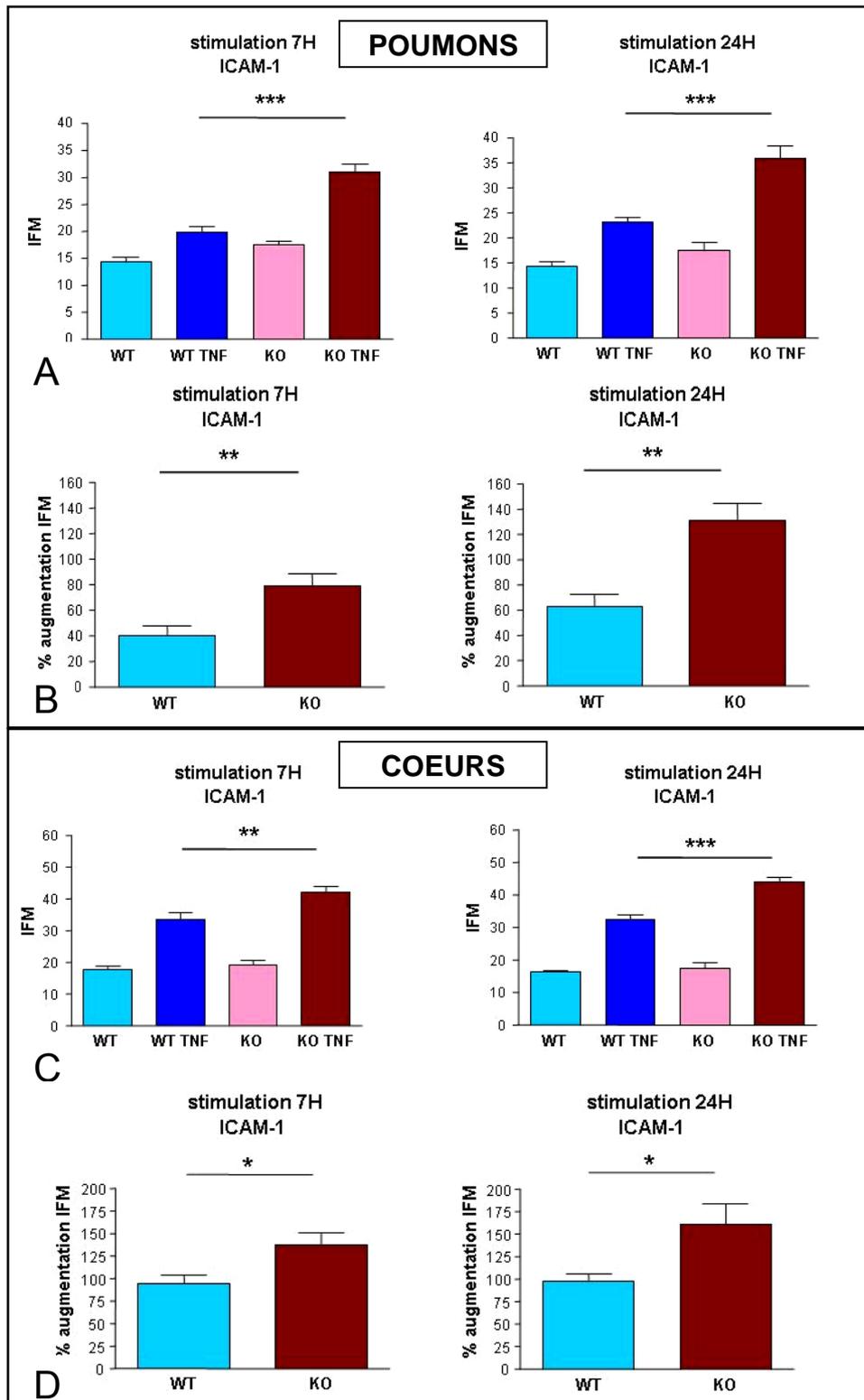


Figure 38 : Analyse par cytométrie de flux de l'expression de la molécule ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y₁, à l'état basal ou après stimulation au TNF α .

Intensité de fluorescence moyenne (IFM) (A et C) et pourcentage d'augmentation de l'IFM (B et D) de la molécule ICAM-1 entre l'état basal et celui stimulé au TNF α , à la surface de cellules endothéliales de poumons (A et B) et de cœurs (C et D) de souris témoins et KO P2Y₁ (n=6-7). *P<0,05 ; ** P<0,01 ; ***P<0,001 ; test de Mann-Whitney. Les cellules endothéliales KO P2Y₁ expriment davantage de molécules ICAM-1 en réponse au TNF α .

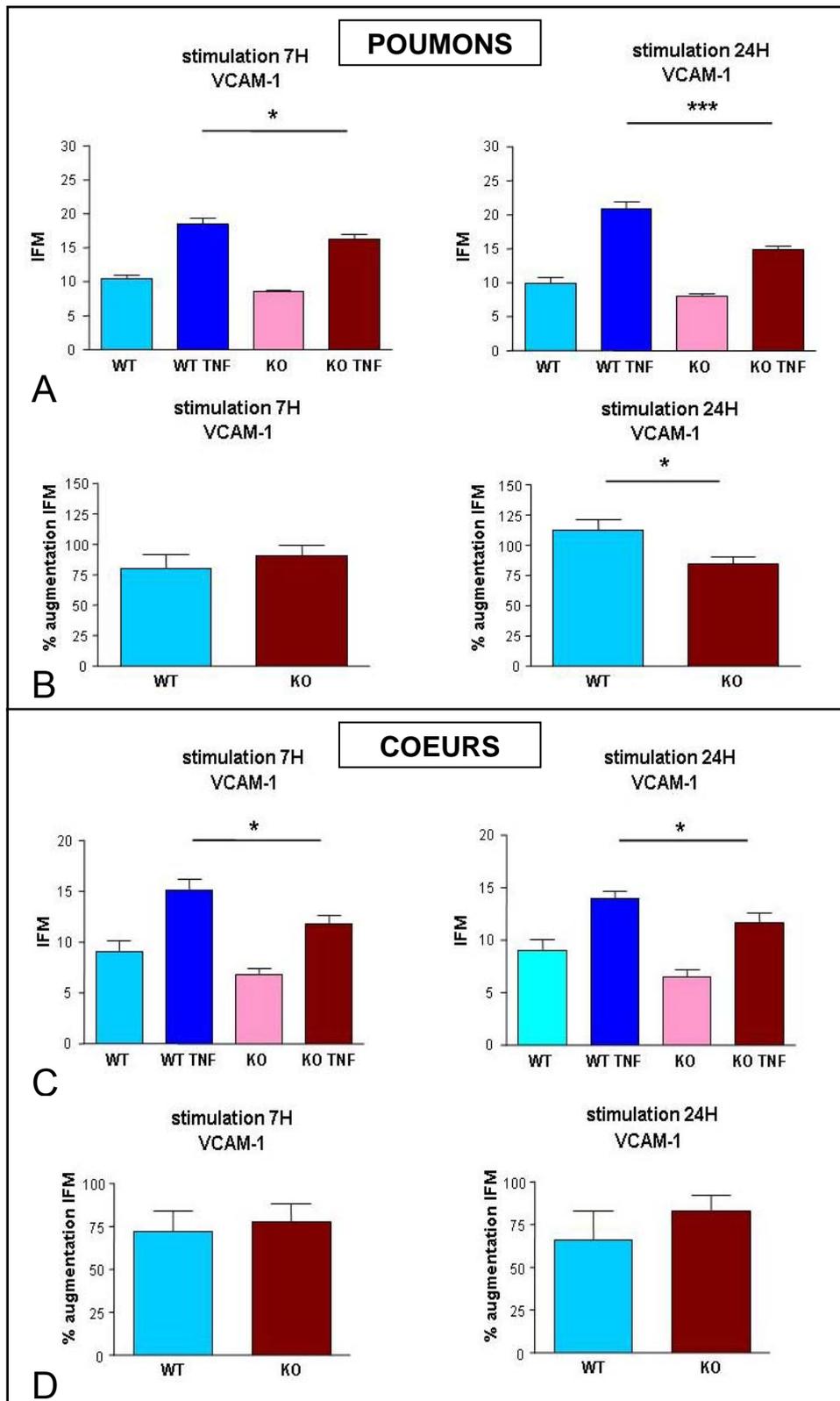


Figure 39 : Analyse par cytométrie de flux de l'expression de la molécule VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y₁ à l'état basal ou après stimulation au TNF α . Intensité de fluorescence moyenne (IFM) (A et C) et pourcentage d'augmentation de l'IFM (B et D) de la molécule VCAM-1 entre l'état basal et celui stimulé au TNF α , à la surface de cellules endothéliales de poumons (A et B) et de cœurs (C et D) de souris témoins et KO P2Y₁ (n=6-7). *P<0,05 ; ***P<0,001 ; test de Mann-Whitney. La différence d'expression de molécules VCAM-1 est minime entre les deux génotypes.

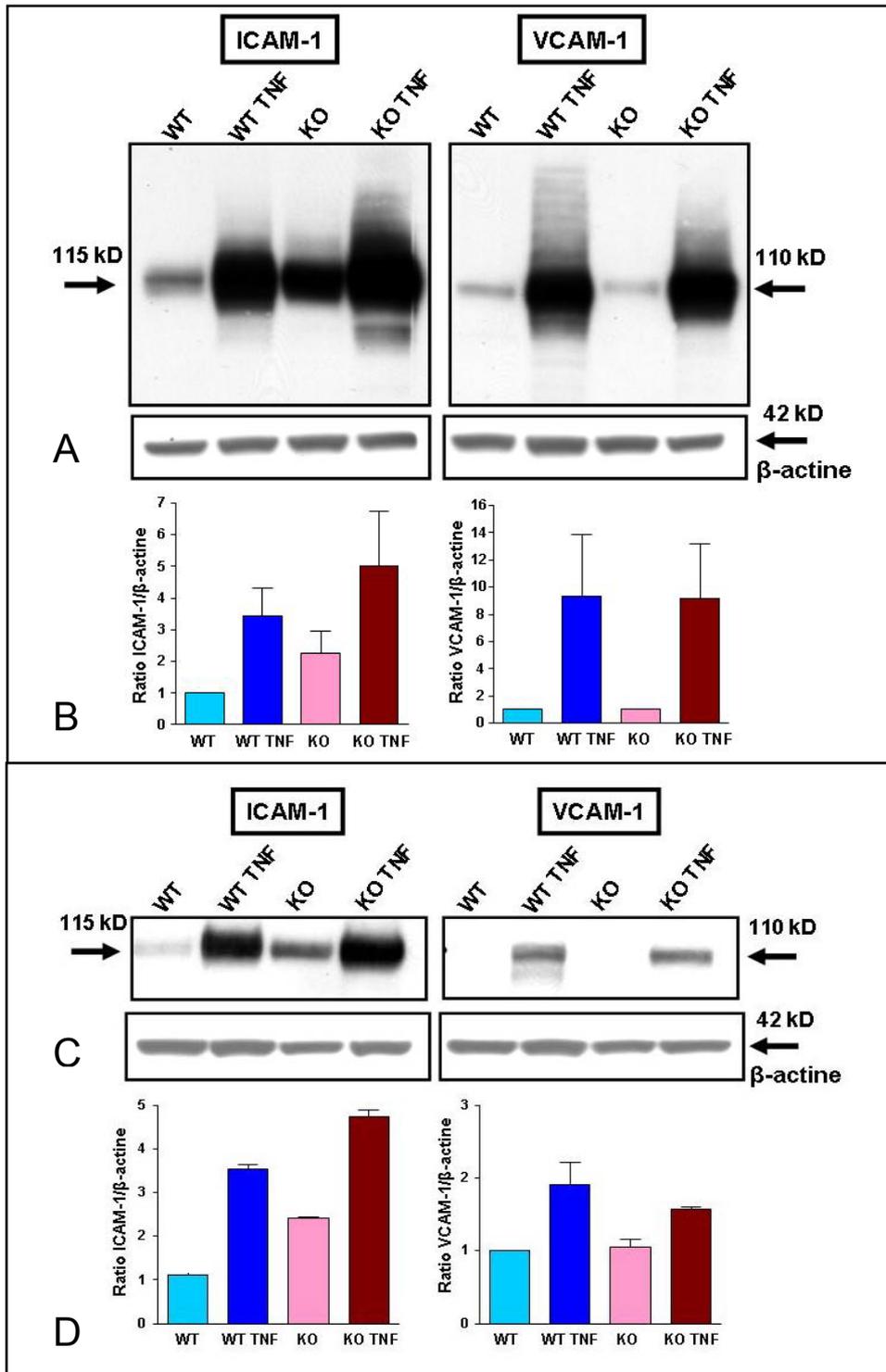


Figure 40 : Analyse par Western blot de l'expression des molécules ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y₁, à l'état basal ou après stimulation au TNF α .

Profil des bandes des molécules ICAM-1, VCAM-1 et β -actine (A et C), et ratios d'intensité des bandes ICAM-1 et VCAM-1 sur β -actine (B et D). Expériences réalisées avec des cellules endothéliales de poumons (A et B) et de cœurs (C et D) de souris témoins et KO P2Y₁, à l'état basal ou après stimulation 7h au TNF α (n=3). Les ratios ICAM-1/ β -actine et VCAM-1/ β -actine sont définis comme étant égaux à 1 pour les cellules endothéliales de souris contrôles non stimulées. Les résultats de Western blot confirment ceux obtenus par cytométrie de flux.

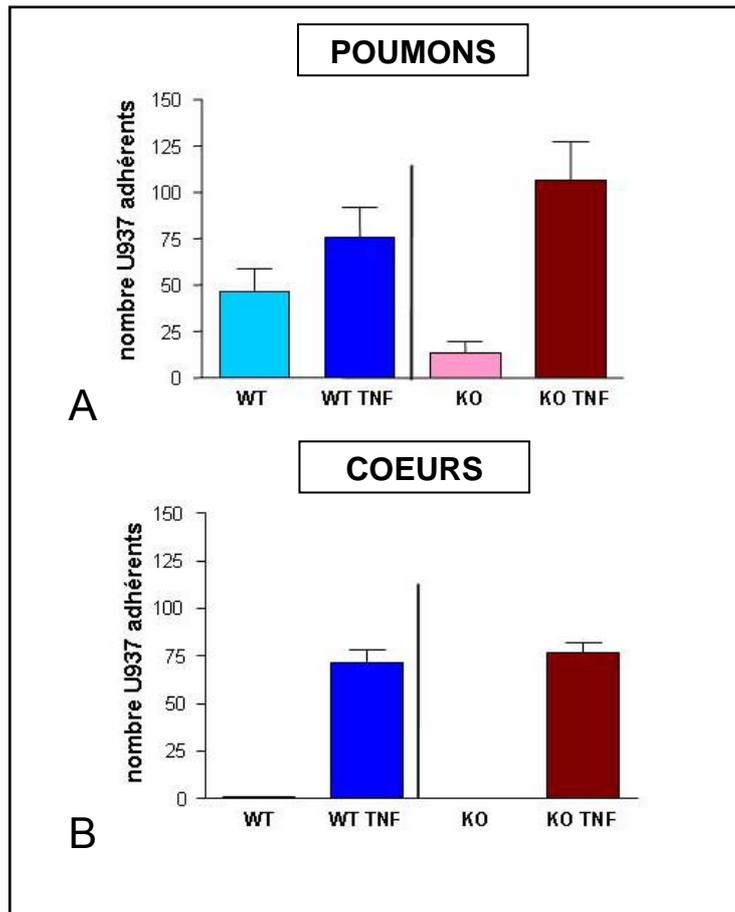


Figure 41 : Adhésion de monocytes humains U937 sur des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y₁ à l'état basal ou après stimulation au TNF α .

Expériences réalisées sur des cellules endothéliales de poumons (A) et de cœurs (B) de souris témoins et KO P2Y₁, à l'état basal ou après stimulation 7h au TNF α (n=3-4).

L'absence de récepteurs P2Y₁ ne semble pas modifier la capacité des cellules endothéliales à lier des monocytes humains.

G. Effet de fortes concentrations d'ADP sur la sécrétion plaquettaire

Parallèlement à l'étude du rôle de récepteurs P2Y dans l'angiogenèse, nous nous sommes intéressés à l'analyse de l'effet des nucléotides sur la sécrétion du contenu des plaquettes sanguines. Les nucléotides extracellulaires régulent les fonctions des leucocytes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, et l'étude de leur rôle sur les fonctions plaquettaires s'inscrit dans le cadre de la compréhension des effets des nucléotides et des récepteurs P2Y dans le système vasculaire.

Les plaquettes sanguines contiennent deux types de granules : les granules α sont riches en protéines comme le facteur plaquettaire 4 (PF4), la β -thromboglobuline (β -TG), le VEGF et le PDGF ; les granules denses renferment de la sérotonine (5-HT), de l'ADP, de l'ATP et du calcium (Rendu and Brohard-Bohn 2001). Concernant l'effet de l'ADP sur la sécrétion plaquettaire, il est connu, qu'en tant qu'agoniste faible des plaquettes, l'ADP n'induit pas la sécrétion du contenu des granules dans un milieu contenant une concentration physiologique de calcium (mM) (Packham, Bryant et al. 1989). En revanche, dans un plasma citraté riche en plaquettes (PRPc), où la concentration en calcium est basse (μ M), l'ADP induit une agrégation secondaire irréversible avec la sécrétion du contenu des granules due à la synthèse de thromboxane A_2 (Mustard, Perry et al. 1975; Packham, Kinlough-Rathbone et al. 1987; Packham, Bryant et al. 1989). Cette réaction est bloquée par l'aspirine. Cependant, une étude a démontré que l'ADP induit, de manière insensible à l'aspirine, l'exposition de P-sélectine, un marqueur des granules α , alors que la sécrétion de [3 H]-sérotonine, un marqueur des granules denses, n'est pas observée (Rand, Perry et al. 1996), suggérant des voies différentes pour la sécrétion des deux types de granules. Ainsi, nous avons voulu vérifier si l'ADP est bien capable d'exposer la P-sélectine de façon indépendante de la formation de thromboxane A_2 dans un milieu contenant une concentration physiologique de calcium. Nous avons aussi analysé d'autres marqueurs de la sécrétion plaquettaire comme le PF4 et la sérotonine afin de pouvoir comparer l'exposition de P-sélectine à ces marqueurs et pour apprécier de façon globale la sécrétion granulaire en réponse à l'ADP.

Nos résultats suggèrent que l'ADP, en forte concentration (100 μ M), est bien capable d'induire la sécrétion des granules α et denses, de manière indépendante de la formation de thromboxane A_2 , mais que cet effet reste faible comparé à celui engendré par un agoniste fort comme le TRAP (agoniste du récepteur PAR-1). L'utilisation d'antagonistes sélectifs des

récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ suggère que ces deux récepteurs sont responsables de l'effet de l'ADP. Cette petite sécrétion induite par l'ADP peut résulter du faible nombre de récepteurs P2Y₁ exprimés à la surface des plaquettes, puisque la surexpression de ce récepteur dans des plaquettes de souris engendre une sécrétion importante des granules en réponse à l'ADP (Hechler, Zhang et al. 2003).

En conclusion, nos données confirment que l'ADP induit une faible sécrétion du contenu des granules plaquettaires et que l'exposition de P-sélectine à la surface des plaquettes est un marqueur global de leur sécrétion.

Ce travail fait l'objet d'une lettre à l'éditeur située en page 155.

III- DISCUSSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail était d'étudier le rôle éventuel des nucléotides et de leurs récepteurs dans l'angiogenèse.

Le récepteur P2Y₄

L'application du modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel à des souris dépourvues de l'expression de ce récepteur a mis en évidence une absence de formation de vaisseaux sanguins et une migration altérée des cellules avec une accumulation importante de macrophages en périphérie du gel. Ce récepteur semble donc être nécessaire à la réponse angiogénique dans ce modèle et son rôle dans l'angiogenèse a d'ailleurs été confirmé dans le modèle d'angiogenèse par injection d'huile de croton dans une poche d'air faite dans le dos de souris (page 130). Le récepteur P2Y₄ semble médier l'effet de l'ATP et de l'UTP sur l'exposition de la molécule adhésive VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales, régulant ainsi l'adhésion de monocytes à leur surface. Dans les deux modèles d'angiogenèse *in vivo*, l'absence de ce récepteur peut engendrer un défaut de recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium. Ces cellules, dès lors différenciées en macrophages dans les tissus sous-endothéliaux, jouent un rôle majeur dans la réponse angiogénique de part leur capacité à sécréter des facteurs mitogéniques et des protéases, nécessaires à la migration des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses par exemple (Sunderkotter, Steinbrink et al. 1994; Condeelis and Pollard 2006). Ce défaut expliquerait l'absence de vaisseaux sanguins et de macrophages dans le centre des gels des souris KO. Cependant, il reste à comprendre pourquoi des macrophages sont présents en périphérie des gels des souris KO et quelles sont leurs fonctions à ce niveau. Il sera aussi nécessaire d'étudier si le défaut d'exposition de la molécule VCAM-1 endothéliale induit par l'absence du récepteur P2Y₄ ne perturbe pas l'activation et la migration des monocytes dans les tissus.

Le récepteur P2Y₂ est pharmacologiquement proche du récepteur P2Y₄ et il est aussi exprimé dans les cellules endothéliales. Il est intéressant de noter que ce récepteur joue également un rôle dans l'exposition de la molécule VCAM-1 à la surface endothéliale en réponse à l'UTP (Seye, Yu et al. 2003) et qu'il apparaît interagir, à ce niveau, avec le récepteur au VEGF (KDR/Flk-1) (Seye, Yu et al. 2004). L'association du récepteur P2Y₄ avec un récepteur à facteur de croissance pourrait être envisagée au niveau endothélial et elle permettrait d'engendrer une réponse inflammatoire.

Il a été démontré que l'UTP induit la migration de cellules endothéliales en culture (Satterwhite, Farrelly et al. 1999). Il apparaît judicieux à ce stade de regarder si des cellules

endothéliales dépourvues de l'expression de ce récepteur ne présentent pas un défaut de migration en réponse à l'ATP ou à l'UTP. Si c'est le cas, l'implication de ce récepteur dans la migration endothéliale pourrait expliquer que les souris KO P2Y₄, en plus d'un défaut de recrutement de monocytes/macrophages au niveau endothélial, possèdent des cellules endothéliales avec une migration réduite et donc un défaut de formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ceci expliquerait les observations faites dans le centre des Matrigels de ces souris. Ces hypothèses nécessiteront d'être vérifiées par des études sur des cellules endothéliales *in vitro*. Dans tous les cas, il semble que ces deux récepteurs ont en commun la propriété d'induire l'activation des cellules endothéliales et l'exposition de la molécule VCAM-1 en réponse aux nucléotides triphosphates. D'après l'ensemble de ces données, il serait aussi intéressant d'étudier le rôle de ce récepteur dans l'athérosclérose, dans la mesure où le recrutement monocyttaire au niveau de l'endothélium et l'exposition de la molécule VCAM-1 sont déterminants dans la formation des plaques d'athérome (Cybulsky, Iiyama et al. 2001; Moreno, Purushothaman et al. 2006).

Le récepteur P2Y₁

L'inactivation de ce récepteur n'induit pas de différences majeures dans les critères d'évaluation de la réponse angiogénique dans le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel, mais l'absence de rôle dans ce modèle ne signifie pas que ce récepteur ne participe pas à la réponse angiogénique. Nous avons montré qu'il ne semble pas vraiment impliqué dans des réponses de la cellule endothéliale suite à son activation, comme l'exposition de la molécule VCAM-1 et dans l'adhésion de monocytes. Son effet sur l'exposition de la molécule ICAM-1 doit être complété par d'autres études.

Au niveau endothélial, il semble plutôt jouer un rôle dans la régulation de la taille et de la perméabilité de ces cellules (Tanaka, Kawasaki et al. 2003; Tanaka, Kawasaki et al. 2004), mais aussi dans la prolifération d'après nos données. Ce récepteur joue un rôle primordial dans les plaquettes sanguines (Léon, Hechler et al. 1999; Léon, Freund et al. 2001). Dans la mesure où les cellules endothéliales et les plaquettes sanguines sont nécessaires à l'angiogenèse (Pinedo, Verheul et al. 1998), le rôle du récepteur P2Y₁ pourrait être mis en évidence dans un modèle *in vivo* d'angiogenèse par injection de cellules tumorales ou dans un modèle de réparation tissulaire après une lésion par exemple. En effet, ces modèles sont dépendants de la prolifération des cellules endothéliales (Hanahan 1998; Pinedo, Verheul et al. 1998), mais aussi de l'activation plaquettaire (Tripathi and Nakada 2002) et ainsi, ils permettraient d'illustrer une fonction du récepteur P2Y₁.

Nous avons montré, dans notre laboratoire, que ce récepteur contribue au développement des plaques d'athérosclérose dans des souris KO ApoE, de part, en partie, son rôle dans l'activation des plaquettes et dans l'exposition de la molécule P-sélectine plaquettaire en réponse à de faibles concentrations d'agonistes (données de B. Hechler). Comme ce récepteur est impliqué dans l'exposition de P-sélectine à la surface des plaquettes, il serait intéressant d'étudier son rôle dans ce phénomène dans la cellule endothéliale. En effet, il a été démontré que la P-sélectine endothéliale joue un rôle important dans l'angiogenèse dans un modèle *in vivo* d'ischémie-reperfusion (Egami, Murohara et al. 2006). Elle permet le recrutement des leucocytes à la surface de l'endothélium activé et leur localisation dans le tissu ischémié où ils sécrètent des facteurs angiogéniques comme le VEGF pour la mise en place de vaisseaux sanguins collatéraux. Si le lien entre le récepteur P2Y₁ et la P-sélectine endothéliale est avéré, le rôle de ce récepteur pourrait être illustré dans le modèle d'angiogenèse d'ischémie-reperfusion. L'étude du rôle de ce récepteur dans un modèle d'ischémie-reperfusion est renforcée par le fait que la formation d'agrégats leucoplaquettaires est importante dans ce modèle ; elle permet de renforcer l'activation des intégrines leucocytaires et donc, leur adhésion à la surface endothéliale, puis leur transmigration et leur localisation dans les tissus ischémiés (Chen and Geng 2006). Or, le récepteur P2Y₁ participe à la formation de ces agrégats *via* l'exposition de la P-sélectine plaquettaire qui interagit avec la molécule PSGL-1 exprimée par les leucocytes (Léon, Ravanat et al. 2003). L'utilisation des lignées cellulaires endothéliales permettra d'aborder la question sur le lien entre le récepteur P2Y₁ et la P-sélectine endothéliale.

Les thiénopyridines

L'utilisation du clopidogrel dans le but d'étudier le rôle du récepteur P2Y₁₂ dans la réponse angiogénique dans ce modèle, s'avère être un outil d'analyse peu satisfaisant dans la mesure où il induit la formation de zones hémorragiques comme son énantiomère inactif sur le récepteur P2Y₁₂ (Defreyn, Gachet et al. 1991). Des études ont démontré que, non seulement l'énantiomère inactif possède des propriétés antiendothéliales, mais aussi la ticlopidine (Klein-Soyer, Ceraline et al. 1997; Mauro, Zlatopolskiy et al. 2004), suggérant donc un effet du clopidogrel sur les cellules endothéliales. A ce niveau, de nombreuses expériences seront nécessaires pour voir à quel(s) niveau(x) le clopidogrel interfère sur les fonctions endothéliales : la prolifération, l'adhésion, la migration ou encore l'organisation en vaisseaux ?

Ainsi, afin de s'affranchir de tout autre effet que celui antiplaquettaire, il serait préférable d'utiliser des souris dépourvues de l'expression du récepteur P2Y₁₂ (Andre, Delaney et al. 2003) pour l'étude du rôle de ce récepteur dans l'angiogenèse dans des modèles *in vivo*. Dans ce cas, il sera intéressant de voir si, dans le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel, ces souris KO présentent une réponse angiogénique altérée, illustrant un rôle des plaquettes sanguines dans l'angiogenèse. Cette observation pourra alors être comparée à l'étude dans laquelle, chez des souris rendues thrombopéniques par l'injection d'un anticorps dirigé contre un récepteur d'adhésion des plaquettes sanguines au fvW, la glycoprotéine Iba, l'angiogenèse est perturbée dans le Matrigel suggérant un rôle majeur des plaquettes dans ce modèle (Kisucka, Butterfield et al. 2006).

Il est intéressant de rappeler ici l'étude dans laquelle les auteurs ont démontré que le traitement de souris à la ticlopidine permet de réduire significativement la taille des plaques d'athérome ainsi que leur contenu en macrophages, suggérant ainsi un effet inhibiteur de cette molécule sur le développement de l'athérosclérose (Jawien, Csanyi et al. 2007). Cependant, cette étude n'a pas déterminé si l'effet de la ticlopidine était la résultante d'une action sur les plaquettes sanguines ou sur d'autres types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose comme les cellules endothéliales. En conclusion, de plus en plus d'études suggèrent que la ticlopidine agit sur des processus menant soit à l'angiogenèse soit à l'athérosclérose (TIMAD 1990; De La Cruz, Arrebola et al. 2003; Jawien, Csanyi et al. 2007).

Le récepteur P2Y₁ dans les cellules endothéliales immortalisées de souris

La deuxième partie de ce travail a consisté à l'établissement de lignées de cellules endothéliales provenant de souris normales et de souris déficientes pour l'expression du récepteur P2Y₁. Ce travail avait pour but de disposer, au laboratoire, d'un moyen d'étudier d'une part, le rôle de ce récepteur dans les fonctions endothéliales et d'autre part, de pouvoir appliquer ultérieurement cette technique à des cellules endothéliales issues de souris dépourvues de l'expression d'autres récepteurs P2Y. L'utilisation de la technique d'immortalisation par injection du vecteur N-TKmT à des cellules endothéliales en culture a permis d'obtenir des cellules immortalisées pures et en grande quantité pour les deux génotypes.

Les expériences de prolifération ont montré que le récepteur P2Y₁ semble être impliqué dans l'effet prolifératif des nucléotides extracellulaires sur ces cellules en culture. Même si ces résultats sont préliminaires et qu'ils nécessitent d'être confirmés avec des cellules endothéliales primaires non immortalisées, cette donnée suggère d'étudier l'impact de

cette fonction dans un modèle *in vivo* de lésion tissulaire où la prolifération endothéliale est très importante pour la réparation du tissu lésé (Pinedo, Verheul et al. 1998).

Dans ces cellules, nous avons également mis en évidence que l'absence de ce récepteur entraîne une expression plus importante de la molécule ICAM-1 et une très légère diminution de VCAM-1, en réponse à une stimulation au TNF α , mais que la conséquence sur l'adhésion de monocytes à leur surface n'est pas significative. Le récepteur P2Y₁ endothélial ne semble pas contribuer de façon majeure aux mécanismes permettant l'adhésion de monocytes, du moins, dans des conditions statiques. Cette donnée peut être surprenante dans la mesure où dans le modèle d'athérosclérose chez les souris KO P2Y₁, non seulement la taille des plaques d'athérome est réduite, mais leur contenu en macrophages est inférieur par rapport aux souris normales (données de B. Hechler). Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que des cellules endothéliales dépourvues de l'expression de ce récepteur présentent un défaut dans l'exposition de molécules adhésives comme ICAM-1 et VCAM-1 après une stimulation. Ce n'est pas le cas dans les lignées endothéliales immortalisées provenant de cœurs et de poumons de souris. Il serait intéressant d'étudier, d'une part ce phénomène avec des cellules endothéliales de souris isolées de territoires vasculaires propices au développement de l'athérosclérose comme l'aorte ou des artères coronaires, et d'autre part, de regarder si l'absence de ce récepteur n'altère pas l'exposition d'autres molécules adhésives endothéliales nécessaires au recrutement leucocytaire comme la P-sélectine. Dans tous les cas, d'après les résultats obtenus dans ces lignées, il semble que le rôle de ce récepteur est de moindre importance dans l'exposition de molécules adhésives et dans l'adhésion de monocytes par rapport aux récepteurs P2Y₂ et P2Y₄. Ceci pourrait illustrer que certains sous-types de récepteurs P2Y endothéliaux ont des rôles bien définis dans certaines fonctions endothéliales.

L'ensemble des données obtenues concernant le rôle du récepteur P2Y₁ dans la cellule endothéliale nécessite d'être complété par d'autres études. En effet, des expériences de RT-PCR et l'utilisation d'anticorps et d'agonistes/antagonistes spécifiques des récepteurs P2Y permettront d'identifier clairement les récepteurs exprimés dans ces cellules. Ceci permettra ensuite de cibler des récepteurs P2Y en particulier pour étudier leur rôle dans la cellule endothéliale *in vitro* et dans des modèles d'angiogenèse *in vivo*. Afin de compléter les études sur l'impact de la surexpression de la molécule ICAM-1 due à l'absence du récepteur P2Y₁, il serait intéressant de tester ces cellules dans un modèle d'adhésion de monocytes en flux. La perfusion de sang total, dont les leucocytes ont été préalablement marqués, à la surface de cellules endothéliales en culture permettrait de mettre en évidence un effet ou non d'un de ces récepteurs sur l'interaction cellules endothéliales/leucocytes dans des conditions de flux.

Perspectives

La mise au point du modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel chez la souris et le développement de lignées endothéliales provenant d'organes de souris permettent d'avoir à disposition, dans notre laboratoire, deux outils importants pour l'étude du rôle de récepteurs ou de toute autre protéine dans l'angiogenèse.

Le modèle par injection de Matrigel chez la souris requière la maîtrise de nombreuses techniques histologiques et l'analyse des résultats obtenus est souvent complexe, mais il possède l'avantage de permettre l'étude de différentes étapes dans la formation des vaisseaux sanguins comme la migration cellulaire et l'organisation en vaisseaux. Ce modèle permet de tirer profit des nombreuses souris transgéniques générées et l'application de ce modèle à des souris déficientes pour l'expression de récepteurs P2Y par exemple, permet d'identifier ceux qui sont impliqués dans l'angiogenèse. Les résultats obtenus dans ce modèle nécessitent d'être confirmés dans un autre modèle d'angiogenèse *in vivo*, plus proche de conditions pathologiques comme l'ischémie-reperfusion, la réparation d'une lésion ou encore la croissance tumorale.

L'utilisation de la technique d'immortalisation de cellules endothéliales de souris permet également de tirer profit des souris transgéniques, mais aussi des techniques visant à inactiver des ARNm codant pour des protéines d'intérêt. Ainsi, elle permet d'étudier précisément le rôle d'un récepteur ou d'autres protéines dans les fonctions endothéliales, sans être limité par les cellules contaminantes et le nombre de passages durant la culture. Grâce à cet outil, des études portant sur les mécanismes régulant l'expression et la désensibilisation des récepteurs P2Y peuvent être envisagées. La recherche de partenaires de ces récepteurs dans des voies de signalisation régulant la prolifération, l'apoptose, la taille mais aussi l'exposition de molécules adhésives ou la migration des cellules endothéliales est réalisable avec ces lignées cellulaires. Enfin, dans le but d'élargir l'étude sur le rôle des récepteurs P2Y dans les fonctions endothéliales, ces cellules peuvent être utilisées dans des expériences utilisant des « microarray » à ADN ou à protéines pour identifier de nouvelles molécules régulées par cette famille de récepteurs. Cependant, l'utilisation de cellules endothéliales primaires non immortalisées humaines et/ou murines permettra de voir si les effets observés dans les cellules immortalisées ne dépendent pas de leur activation constitutive par l'expression de la protéine mT.

IV- ANNEXES

Annexe 1:

Loss of P2Y₄ receptor expression leads to *in vivo* inflammatory disorders.

Didier Communi¹, Nicolas Lantz² *et al.*

Article en préparation.

¹ Institute of Interdisciplinary Research, IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

² INSERM U.311, Strasbourg, France; EFS-Alsace, Strasbourg, France; Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

³ Département Thrombose & Angiogenèse, Service de Pharmacologie, Sanofi-Aventis, Toulouse, France.

⁴ Department of Medical Chemistry, Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

Correspondence: Didier Communi; communid@ulb.ac.be

Institute of Interdisciplinary Research (IRIBHM), ULB, Building C (5th floor), Campus Erasme, 808 Route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium.

Tel: + 32.2.555.41.59, Fax: + 32.2.555.46.55

Ce travail fait l'objet d'une collaboration scientifique avec l'équipe du Professeur Jean-Marie Boeynaems de l'Université Libre de Bruxelles en Belgique, qui a établi les souris déficientes pour l'expression du récepteur P2Y₄. Les résultats obtenus avec le modèle d'angiogenèse par injection de Matrigel avec ces souris et présentés en page 82, ont été le point de départ de différentes expériences *in vivo* et *in vitro* dont le but était d'expliquer le défaut d'angiogenèse observé dans ce modèle. Ce manuscrit présente donc, dans un premier temps, les données obtenues dans notre laboratoire, puis dans un deuxième temps, les résultats d'un second modèle d'angiogenèse chez la souris. Enfin, des données obtenues avec des cellules endothéliales de souris normales et de souris KO P2Y₄ sont exposées et elles permettent d'identifier une fonction de ce récepteur dans ces cellules.

Introduction

The P2Y₄ is a nucleotide receptor which belongs to the P2Y family of G-protein-coupled receptors. The human P2Y₄ receptor is a UTP receptor (Communi et al, 1995; Nguyen et al, 1995; Stam et al, 1996; Nicholas et al, 1996) coupled to the phosphoinositide/Ca²⁺ pathway. Studies have described ATP as a partial agonist (Communi et al, 1996) or a full antagonist (Kennedy et al, 2000) of human P2Y₄ receptor, most probably depending on the level of P2Y₄ expression in transfected cell lines. The cloned rat and mouse orthologs of human P2Y₄ receptor are activated equipotently by UTP and ATP (Bogdanov et al, 1998; Webb et al, 1998; Lazarowski et al, 2001) comparably to murine P2Y₂ receptor which is ubiquitously expressed. Human P2Y₄ mRNAs have been detected in the placenta (Communi et al, 1995) whereas murine P2Y₄ mRNAs were detected in stomach, intestine and liver (Suarez-Huerta et al, 2001). Functional responses to UTP associated to the presence of P2Y₄ receptor have been reported in rat aortic smooth muscle cells (Harper et al, 1998), in submucosal cells derived from human lungs (Communi et al, 1999) and in epithelial cells of gerbil inner ear (Marcus and Scotfield, 2002). So far a loss of nucleotide-induced epithelial chloride transport has been observed in the jejunum of P2Y₄ knockout mice (Robaye et al, 2003).

The potential involvement of extracellular nucleotides in angiogenesis has been poorly studied. Chemotactic and mitogenic actions of UTP on guinea pig coronary endothelial cells have been associated to P2Y₄ receptor expression (Satterwhite et al, 1999). Interestingly vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression is regulated through interactions between P2Y₂ nucleotide receptor and VEGF receptor-2 in human coronary endothelial cells (Seye et al, 2004). These data suggested that the activation of P2Y receptors could regulate mechanisms of cooperativity between inflammation and angiogenesis.

In this paper, we have identified for the first time that a loss in the expression of a nucleotide receptor, the murine P2Y₄ receptor, is associated with a defect in macrophage adhesion on primary endothelial cells *in vitro* and to inflammatory disorders *in vivo*.

Material and methods

Material

Matrigel and Matrisperse were obtained from BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France). UTP, ATP, ADP, UDP, VEGF, FGF-2, Sphingosine 1-phosphate (S1P), Drabkin kit, mouse IgG_{2a}, trypsin were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Paraformaldehyde and paraffin were from Merck Eurolab (Strasbourg, France). Serum, biotinylated antibody and Novared kit were obtained from Coger (Paris, France). Anti-PECAM-1 antibody was purchased from BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France). Anti-F4/80 and anti-neutrophil antibodies were purchased from Argène (Varilhes, France) and the rat isotypes IgG_{2a} and IgG_{2b} antibodies were obtained from BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France). The anti-VCAM-1 blocking antibody was purchased from R&D Systems (Abingdon, UK). Collagenase B and DNase I grade II were purchased from Roche Diagnostics (Vilvorde, Belgium). Calcein, Taq DNA polymerase and Superscript II Reverse Transcriptase were obtained from Invitrogen (Merelbeke, Belgium).

Matrigel experiments

P2Y₄^{0/+} (wild-type) and P2Y₄^{0/-} (knock-out) CD1/ C57BL/6 mice were generated in our institute (Robaye et al, 2002). Matrigel was liquefied overnight at 4°C. The angiogenic factors (1,4 µg/mL VEGF, 8 µg/mL FGF-2 and 500 nM S1P) and 116 µg/mL BSA Fatty Acid Free were added to the Matrigel solution. The factors were added to obtain an angiogenic response as described in the Matrigel mouse model (Passaniti, Taylor et al. 1992; Lee, Kim et al. 1999;

Goepfert, Sundberg et al. 2001). Moreover this cocktail of factors has allowed to identify the involvement of CD39 ectonucleotidase in the angiogenic response (Goepfert, Sundberg et al. 2001). Six to 8 week-old mice were anesthetized and the Matrigel solution (400 μ L) was subcutaneously injected in the median line of the abdomen. Matrigel plugs were collected 14 days after injection, rinsed with PBS and fixed with paraformaldehyde 4 % overnight at 4°C. Paraffin slides (5 μ m) were then realized with the Matrigel plugs using a microtome. Hematoxylin-eosin (HE) coloration was realized using a previously described standard method (Silverton and Anderson 1961). Cells having migrated in the Matrigel were colored with HE and total area occupied by colored cells is quantified using a microscope (Leica DMR, Leica Microsystems SA, Wetzlar, Germany) coupled with a camera (Roper Scientific, Tucson, US). The image analysis software Metamorph (Universal Imaging Corp., West Chester, US) defines in the Matrigel several fields to cover the abdominal part or the center of the Matrigel (up to 20 different fields to cover the whole gel). The cellularities in the selected areas were expressed in pixels and represented the ratio between the area of colored cells and the total area of the selected field X 100. For each Matrigel slide, we calculated a mean of the cellularity in all the different fields. The data displayed were mean of at least three different slides covering the totality of the Matrigel.

Additional labeling have been performed using anti-PECAM-1 (endothelial cells) or anti-F4/80 (macrophages) monoclonal antibodies and corresponding control antibodies respectively, anti-IgG_{2a} and anti-IgG_{2b}. Anti-PECAM-1 antibody was used during one night at 2 μ g/mL and anti-F4/80 was used during 2 h at 20 μ g/mL.

Murine air pouch granuloma

This model of inflammatory angiogenesis was performed essentially as described by Colville-Nash et al., 1995. Five-milliliter air pouches were raised on the dorsal surface of

female mice under anesthesia. After 4 h, 0.5 mL of 0.1% v/v croton oil in Freund's complete adjuvant (both from Sigma) was injected into the pouch. Eight days after angiogenesis induction, animals were anesthetized and a vascular cast was made by intravenous injection of 1 mL of a solution of 5 % carmine red /10% gelatin. The granuloma tissue was then removed, weighed, dried for 2 days, and digested. Carmine content was determined against a carmine standard curve read at 490 nm.

Isolation of primary endothelial cells

Primary endothelial cells were isolated from mouse hearts and lungs as previously described (Marelli-Berg et al., 2000). Hearts and lungs have been collected from 6 to 8 weeks-old $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice and minced using sterile razorblades. After a treatment with collagenase (2 mg/mL) and DNase I treatment (0,5 mg/mL), primary endothelial cells were removed from the interface of a 25%-40% Percoll gradient. Primary endothelial cells isolated were then cultured in Biocoat Collagen dishes (Becton Dickinson) or in gelatin-coated dishes using complete medium containing EBM medium and EGM singlequots (2% FBS, 10 ng/mL EGF, 1 μ g/mL hydrocortisone and 12 μ g/mL bovine brain extract) from Clonetics (BioWhittaker Europe, Cambrex, Verviers, Belgium) and 100 μ g/mL heparin (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium).

RT-PCR experiments

Total RNAs were extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Groningen, The Netherlands) and RNeasy kit column (Qiagen, Hilden, Germany) from mouse resident and thioglycollate-elicited $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ macrophages as well as from primary endothelial cells isolated from $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ hearts and lungs. After reverse-transcription, PCR experiments were performed using specific primers for mouse $P2Y_2$ and $P2Y_4$ receptors, 30

cycles of amplification, the appropriate hybridization temperature and Taq DNA polymerase from Invitrogen.

Inositol phosphates measurements

P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} primary endothelial cells were labeled for 24 h with 10 µCi/mL [³H]-inositol in inositol-free DMEM containing 5% fetal calf serum, antibiotics, amphotericin, sodium pyruvate. Cells were incubated for 2 h in Krebs-Ringer Hepes (KRH) buffer of the following composition (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 1.45 mM CaCl₂, 1.25 mM KH₂PO₄, 25 mM Hepes (pH 7.4) and 8 mM glucose). Endothelial cells were then challenged with UTP, ATP, UDP or ADP (100 µM each) for 30 s. The incubation was stopped by the addition of an ice-cold 3% perchloric acid solution. IP were extracted and separated on Dowex columns as previously described (Communi et al, 1995).

Quantitative RT-PCR experiments

P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} primary heart endothelial cells were stimulated by UTP (100 µM), ATP (100 µM) or TNF-α (100 ng/mL) for 6 hours in the complete medium. Total RNAs were isolated as described above. RNA was reverse transcribed using random hexamers and Superscript II Reverse Transcriptase. VCAM-1 and β-actin specific primers were selected using Primer Express 2.0 software (PCR product size: 100–150 bp; primer size: 20–25 bp; T_m: 58 to 60 °C). RT-PCR amplification mixtures (25 µL) contained 2 ng template cDNA, Power SYBR Green PCR Master Mix (12,5 µL) (Applied Biosystems) and 200 nM forward and reverse primer. Reactions were run on a 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). The cycling conditions were: 10 min for polymerase activation at 95°C and 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. Mean ± S.D. were obtained for each gene using

qBase software. Each assay was performed in duplicate for at least three independent preparations of endothelial cells.

Macrophage adhesion assays

P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} primary endothelial cells were plated in 6-well plates at 5.10⁵ cells per well. Endothelial cells were then stimulated or not during 24 h with UTP (100 μM) or ATP (100 μM). RAW 264.7 macrophages labeled during 2 h with calcein (10 μg/ml) were laid at 5.10⁵ cells per dish on confluent P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} endothelial cells (two dishes per condition). After 2 h at 37°C, dishes were rinsed twice with PBS and adhesion of RAW264.7 macrophages was measured by manual counting of 15 randomly chosen fields per experimental point using a microscope at 100X magnification. In some experiments, endothelial cells were preincubated with an anti-VCAM-1 blocking antibody (5 mg/ml) during the last 3 h of nucleotide stimulation.

Results

Matrigel experiments

P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice (six to eight week-old) have been anesthetized and injected in the median line of the abdomen with Matrigel solution complemented with angiogenic factors (1,4 μg/mL VEGF, 8 μg/mL FGF-2 and 500 nM S1P). The same cocktail of factors has allowed to identify the involvement of CD39 ectonucleotidase in the angiogenic response (Goepfert, Sundberg et al. 2001). Matrigel plugs were collected 14 days after injection, fixed with paraformaldehyde and paraffin slides (5 μm) were then realized using a microtome.

First, hematoxylin-eosin coloration of the Matrigel plugs were realized for both P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice (Fig. 1A). In wild-type P2Y₄^{0/+} mice, cells were detected in the periphery and the center of the Matrigel whereas in P2Y₄^{0/-} mice, large parts of the Matrigel were not infiltrated

at all by cells leading to its fragilization and a significant accumulation of cells in the periphery of the Matrigel (Fig. 1A). Figure 1B showed Matrigel pictures obtained for four $P2Y_4^{0/-}$ mice and confirmed a global lack of cellular infiltration in mice deficient for $P2Y_4$ receptor. Total area occupied by colored cells were quantified to allow the comparison of the cellularities between $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice (Fig. 1C). No genotypic difference was observed in the abdominal side of the Matrigel but a significant difference was observed in the center of the Matrigel (Fig. 1C).

To identify the nature of the cells detected in the hematoxylin-eosin coloration, specific labeling of macrophages and endothelial cells were realized using respectively F4/80 and CD31 antibodies on Matrigel slides (Fig. 2A and 2B). We observed the presence of macrophages on the abdominal side and the center of Matrigel in wild-type mice (Fig. 2A). On the contrary, macrophages are located only at the periphery of the gel in the $P2Y_4^{0/-}$ mice (Fig. 2A). In a similar way, endothelial cells were detected in wild-type mice at the periphery and the center of the Matrigel and organized in functional vessels whereas in $P2Y_4^{0/-}$ mice, CD31 positive-vascular structures were only detected in the abdominal side of Matrigels (B1 and B3) and were totally absent in their center (panels B2 and B4).

Murine air pouch granuloma

Then we used $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice (6 to 8 week-old) in a second angiogenesis model. Air pouches were raised on the dorsal surface of $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice and injected with croton oil in Freund's complete adjuvant. Eight days after angiogenesis induction, animals were anesthetized and a vascular cast was made by intravenous injection of carmine red. The granuloma tissue was then removed to determine dry granuloma weight. We observed a significant reduction of granuloma weight in $P2Y_4^{0/-}$ mice compared to $P2Y_4^{0/+}$ mice. The dry weight of granuloma tissue was 191.4 ± 5.5 mg and 157.0 ± 8.1 mg respectively in $P2Y_4^{0/+}$

and P2Y₄^{0/-} mice (mean ± s.e.m of ten mice tested for each genotype; **=P<0.01) which represented 18% of weight reduction (Figure 3). A comparable reduction of dye content was observed: 0.91 ± 0.06 mg in P2Y₄^{0/+} mice and 0.71 ± 0.06 in P2Y₄^{0/-} mice (mean ± s.e.m. of ten mice tested for each genotype; **=P<0.01) corresponding to 22% of dye content reduction (Figure 3).

Study of P2Y₄ and P2Y₂ receptors mRNA expression in mouse macrophages and endothelial cells

The lack of macrophage infiltration in the angiogenesis models described above could suggest a defect in macrophage chemotaxis or transmigration through endothelial cells (ECs). Intraperitoneal injection of thioglycollate were realized in P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice. First, the UTP calcium response obtained in response to UTP 100 μM was comparable in P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} macrophages and most probably due to P2Y₂ expression (Fig. 4A). No expression of P2Y₄ mRNAs was detected in resident or elicited macrophages (Fig. 4B). The percentage of P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} macrophages collected as well as F4-80 or Mac-1 staining were also similar (Fig. 4C and 4D).

We decided then to investigate the potential expression and involvement of P2Y₄ receptor in various endothelial cell types in view of the inflammatory disorders observed in P2Y₄ knock out mice. It is well known that P2Y₂ receptor is ubiquitously expressed but P2Y₄ expression is restricted to a few tissues and cell types. Primary ECs were isolated from P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} hearts and lungs by collagenase digestion followed by a Percoll gradient. Primary ECs isolated from heart and lung were plated on gelatin- or collagen-coated dishes. The adhesion of primary endothelial cells was more efficient on gelatin-coated dishes and produced sufficient culture yields.

First RT-PCR experiments were realized using P2Y₄^{0/+} heart and lung ECs to determine potential expression of P2Y₂ and P2Y₄ receptors. We detected P2Y₂ mRNAs in the two types of ECs whereas P2Y₄ mRNAs was detected in ECs isolated from heart but not from lung (Fig. 5).

Functional expression of native P2Y₄ receptors in primary endothelial cells isolated from mouse hearts

Concentration-action curves were performed for UTP, ATP and Ap₄A in heart primary ECs using inositol phosphates assays (Fig. 6A). UTP was more potent and active than ATP and Ap₄A (Fig. 6A). Then we compared ATP, UTP, ADP and UDP response in both P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} heart ECs. A significant reduction of the UTP response was observed whereas ATP response was weakly affected (Fig. 6B). Native P2Y₄ receptors expressed in heart ECs appeared to display a preference for UTP. ATP and UTP displayed comparable effect in P2Y₄^{0/-} ECs which is compatible with P2Y₂ expression (Fig. 6B).

The coexpression of both P2Y₂ and P2Y₄ receptors as well as a pharmacological profile similar to the one obtained in heart primary endothelial cells were observed in endothelial cells isolated from P2Y₄^{0/+} Matrigel plugs (data not shown).

Involvement of P2Y₄ and P2Y₂ receptors in VCAM-1 expression on primary endothelial cells isolated from mouse heart

We used primary cultures of heart ECs as a model of native P2Y₂ and P2Y₄ coexpression. An increase in VCAM-1 expression after P2Y₂ activation has been previously described in human coronary artery endothelial cells (Seye et al, 2003). We decided to quantify the level of VCAM-1 expression in P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} heart ECs in basal and stimulated conditions by quantitative PCR analysis (Table 1). We observed that UTP, ATP and TNF were able to

strongly increase the level of VCAM-1 mRNAs in P2Y₄^{0/+} heart ECs. The effect of UTP and ATP were significantly inhibited in P2Y₄^{0/-} heart ECs whereas TNF-mediated increase of VCAM-1 was unaffected.

Adhesion assays of RAW 264.7 macrophages on primary P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} hearts ECs were realized (Fig. 7). Primary ECs were stimulated or not with UTP 100 μM during 24 h and RAW 264.7 macrophages were allowed to adhere during 2 hours on these unstimulated and stimulated ECs. These adhesion assays allowed us to observe that a pretreatment of P2Y₄^{0/+} ECs by UTP increase consistently the adhesion of RAW 264.7 macrophages (Fig. 7). Interestingly, the effect of UTP on macrophage adhesion was strongly inhibited in heart P2Y₄^{0/-} ECs (Fig. 7). We also demonstrated that the effect of UTP on macrophage adhesion involved an up-regulation of VCAM-1 expression on ECs (Fig. 8). Effectively a strong effect of an anti-VCAM-1 blocking antibody on the UTP-mediated adhesion was observed (Fig. 8).

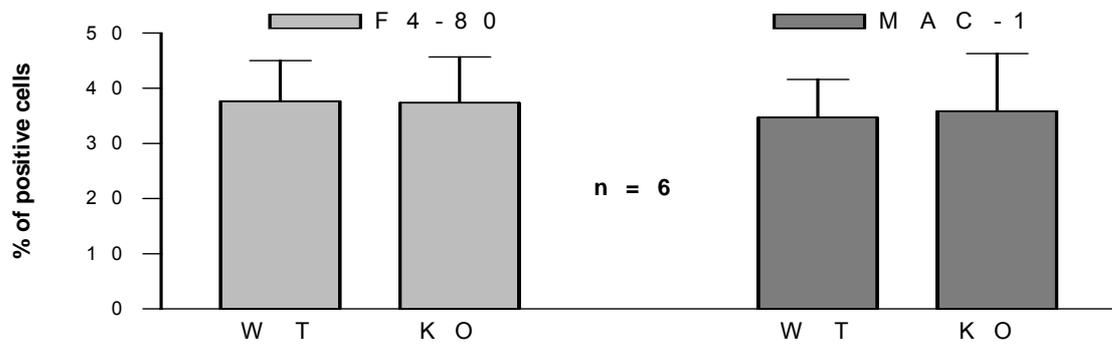


Table 1: Quantitative PCR analysis of VCAM-1 regulation in response to ATP, UTP and TNF in primary endothelial cells isolated from $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice. The data represent the copies of VCAM-1 per 1000 copies of β -actin and are mean \pm SD of 3 independent experiments using 4 $P2Y_4^{0/+}$ and 4 $P2Y_4^{0/-}$ mice per experiment.

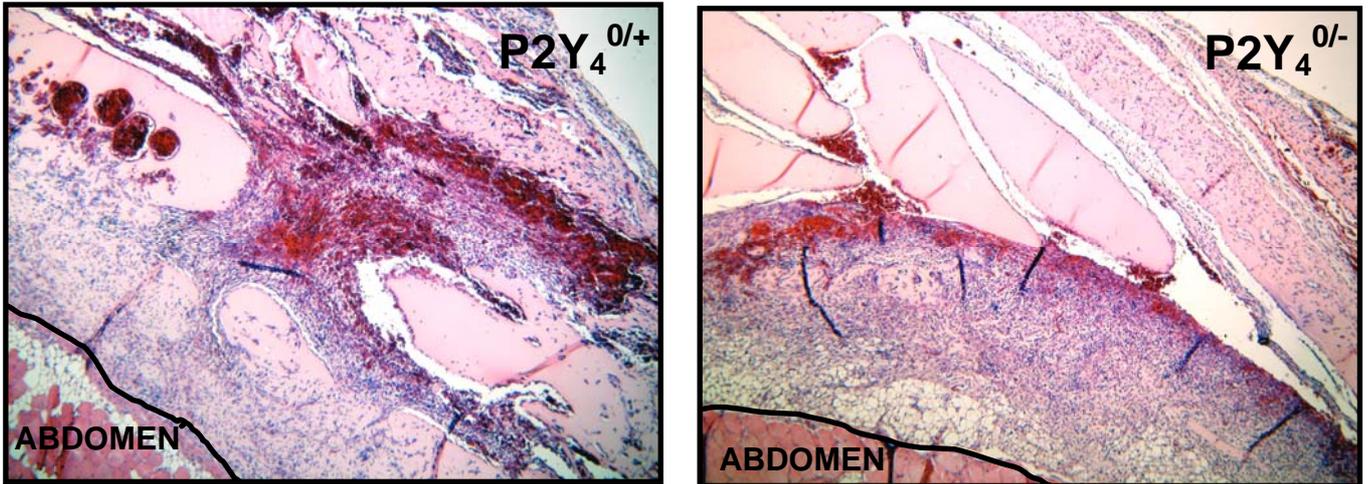


Figure 1: Reduced cellular infiltration in Matrigels injected in $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice.

A: Matrigels injected in $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice and colored with hematoxylin-eosin after 14 days (x10).

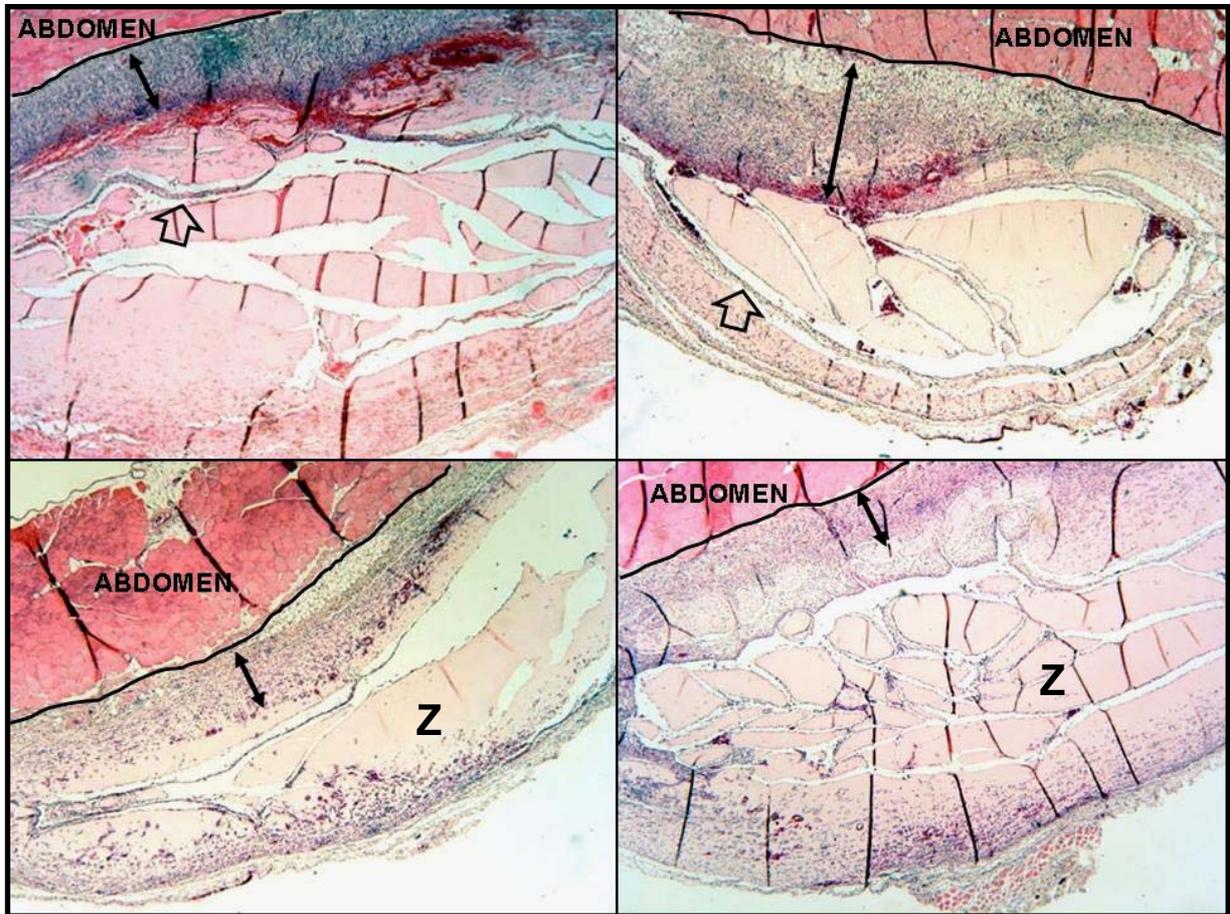


Figure 1: Reduced cellular infiltration in Matrigels injected in $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice.

B: Hematoxylin-eosin coloration of Matrigels injected in four $P2Y_4^{0/-}$ mice. Pictures of the Matrigel removed from four different $P2Y_4^{0/-}$ mice were realized 14 days after injection. (x4). Large zones (Z) of the Matrigel without cellular infiltration and vessels are indicated. On the abdominal side, large bands with high cellular density are indicated by a double black arrow. Thin layers of cells around empty Matrigel were observed and indicated on the upper panels by an empty arrow.

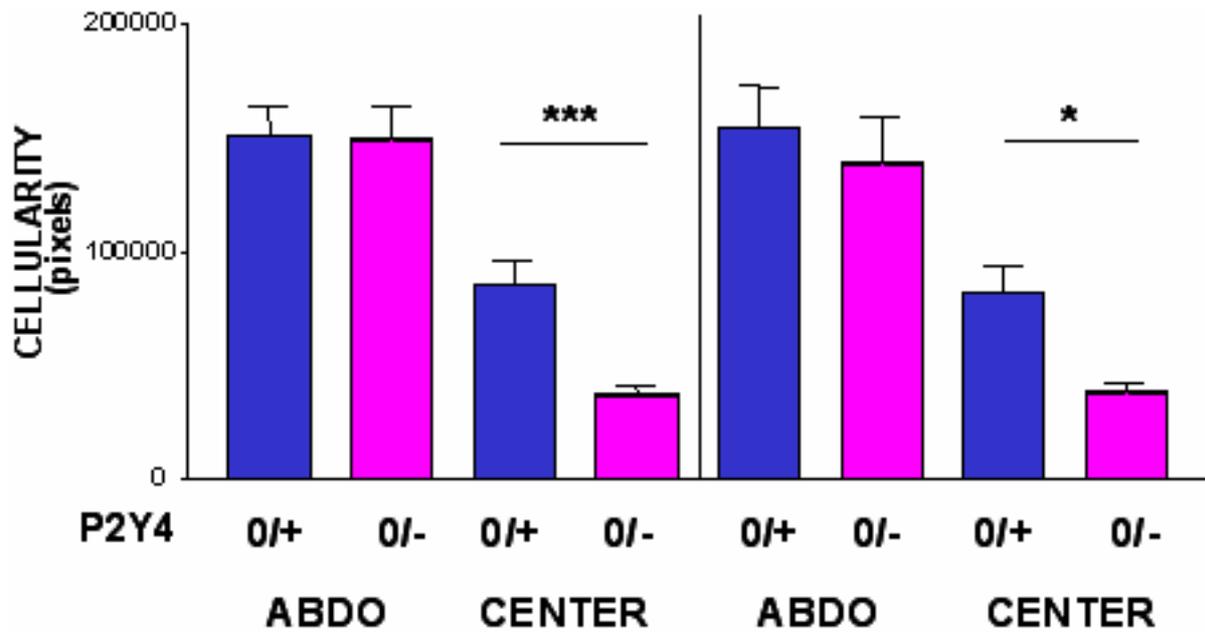


Figure 1: Reduced cellular infiltration in Matrigels injected in P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice.

C: Cellularities at day 14 in the abdominal side and the center of the Matrigels injected in P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice. Mann-Whitney analysis were performed (N=6; ***=P<0.001; *=P<0.05).

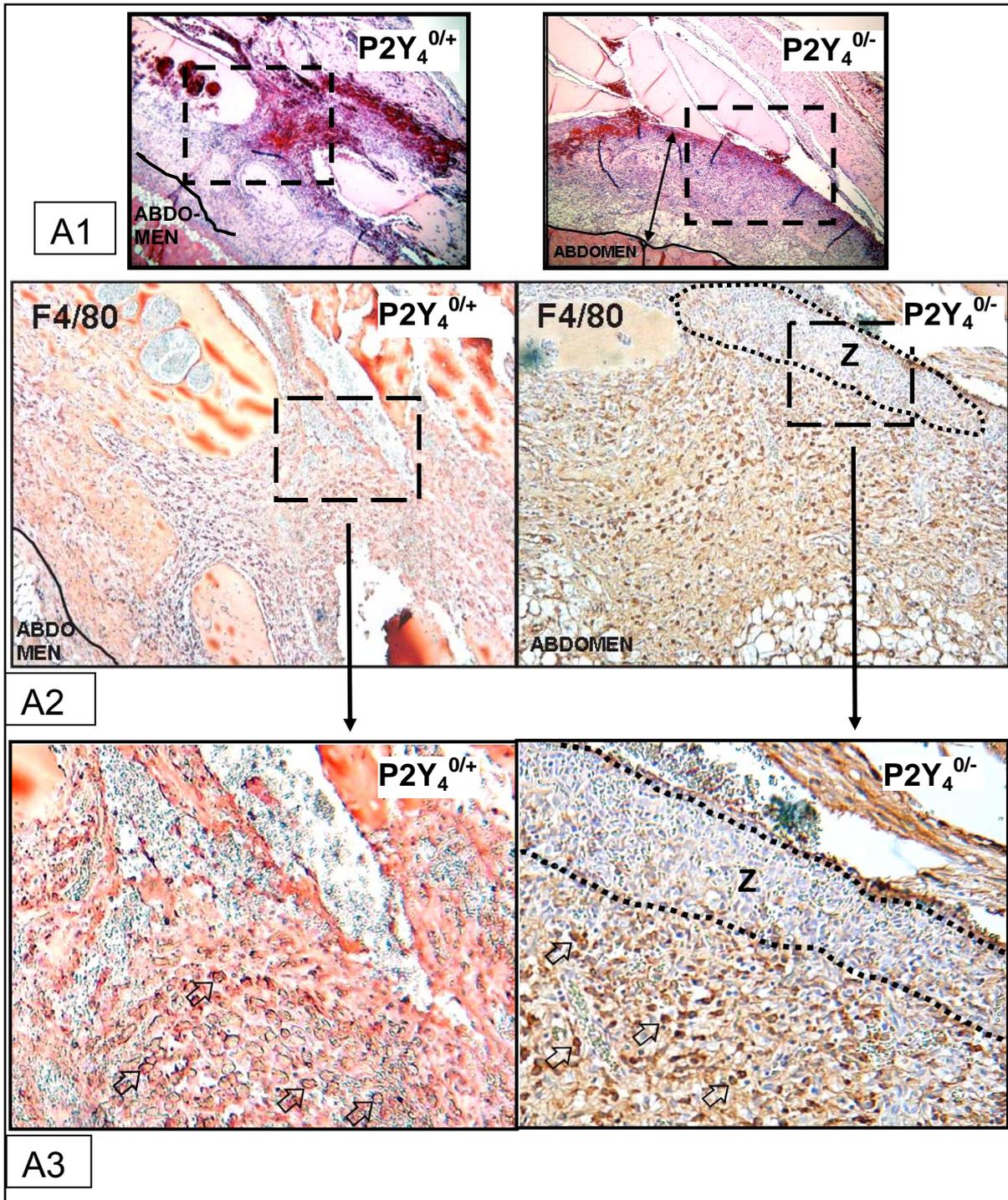


Figure 2

A: Labeling of macrophages infiltrating Matrigels injected in $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice.

A1. Hematoxylin-eosin coloration of Matrigels injected in $P2Y_4^{0/+}$ and $P2Y_4^{0/-}$ mice (x10).

A2. F4/80 labeling of macrophages located on the abdominal side in the zones corresponding to the rectangles displayed in panel A1. **A3.** F4/80 labeling of macrophages located in zones corresponding to the rectangles displayed in panel A2 at the junction between the abdominal side and the center of the Matrigel. Some F4/80 labeling was indicated with empty arrows. Zones indicated with a Z represent zones without any labeling.

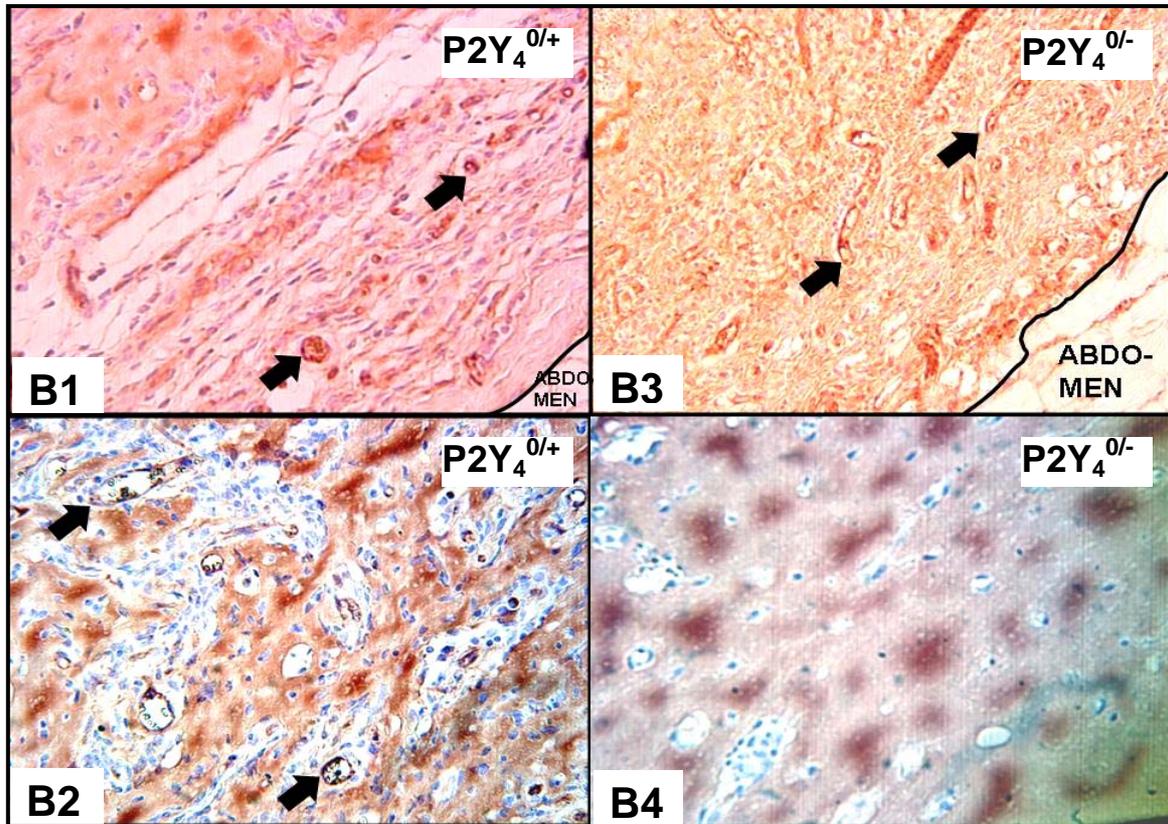


Figure 2

B: Labeling of endothelial cells infiltrating Matrigels injected in P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice.

B1-B2: PECAM-1 labeling of endothelial cells are indicated by black arrows on the abdominal side (**B1**) and the center (**B2**) of the Matrigel in P2Y₄^{0/+} mice (x10).

B3-B4: PECAM-1 labeling of endothelial cells are indicated by black arrows on the abdominal side (**B3**) and the center (**B4**) of the Matrigel in P2Y₄^{0/-} mice (x10).

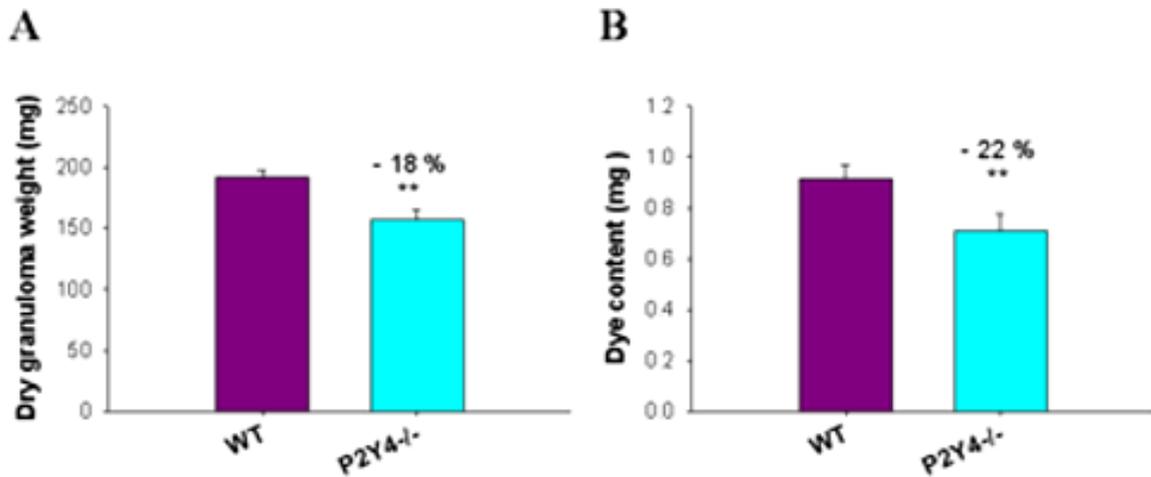


Figure 3: Air pouch granuloma analysis of P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice.

Air pouches were raised on the dorsal surface of ten P2Y₄^{0/+} and ten P2Y₄^{0/-} mice under anesthesia. Four hours later croton oil in Freund's complete adjuvant was injected into the pouch. Eight days after angiogenesis induction, animals were anesthetized and a vascular cast was made by intravenous injection of carmine red and gelatin. The granuloma tissue was then removed to determine dry weight (A) and carmine content (B) (**=P<0.01).

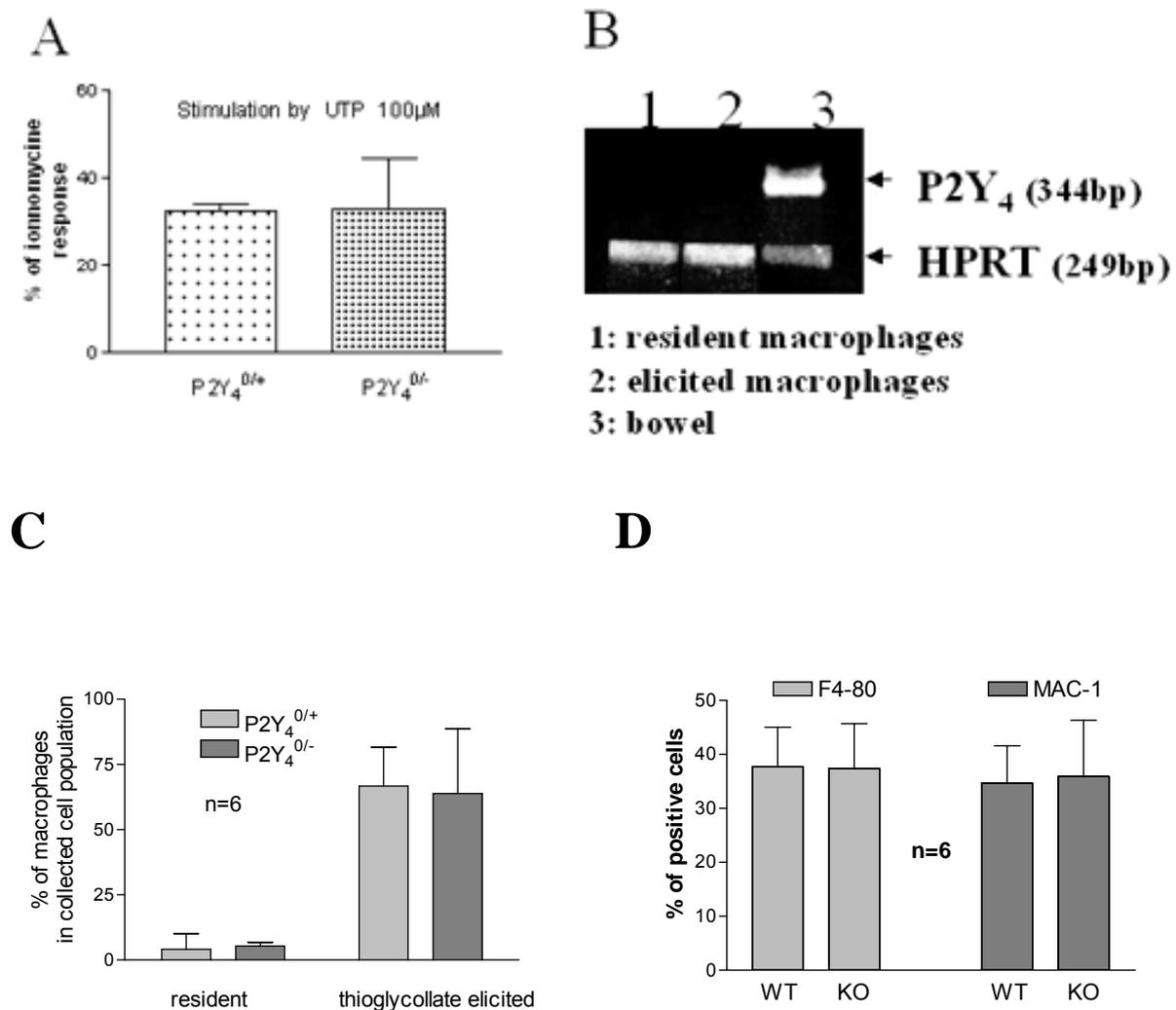


Figure 4: Absence of P2Y₄ expression in mouse peritoneal macrophages.

A: Calcium response obtained in response to UTP 100 μ M in mouse P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} macrophages. The calcium effect was expressed in percentage of ionomycine response.

B: RT-PCR experiments using specific primers of mouse P2Y₄ receptor and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT; positive control) and cDNA obtained after reverse transcription of RNA extracted from resident and elicited macrophages and bowel.

C: Percentage of resident or thioglycollate-elicited macrophages after its peritoneal injection to P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice.

D: Comparison of F4/80 or Mac-1 peritoneal positive cells between P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice.

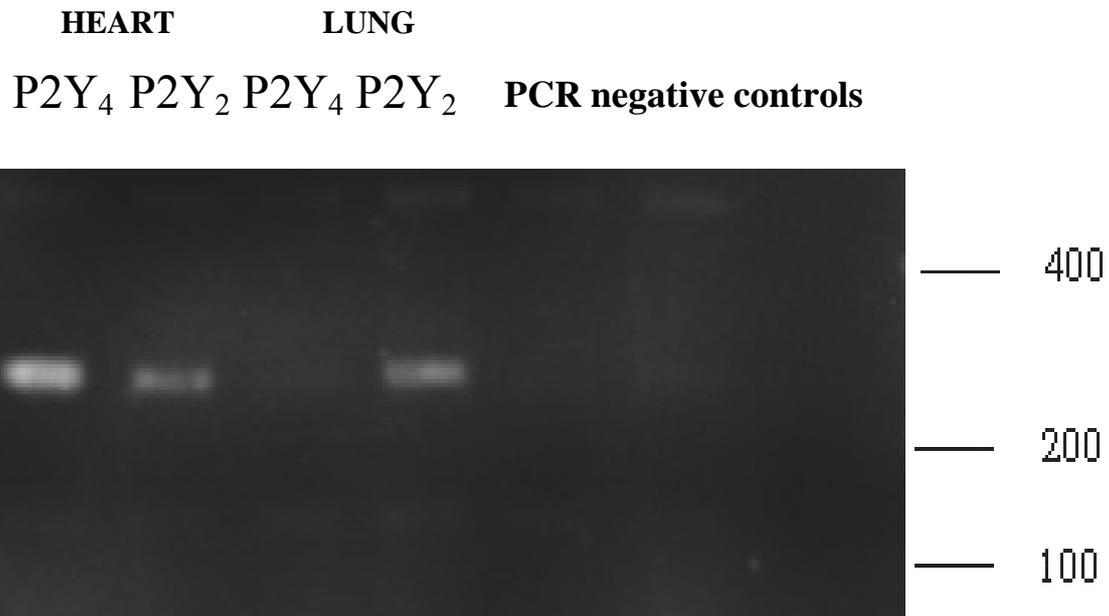


Figure 5: Expression of P2Y₂ and P2Y₄ receptors mRNA in primary endothelial cells isolated from heart or lung of P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} mice. RT-PCR experiments using specific primers of mouse P2Y₂ and P2Y₄ receptors and cDNA obtained after reverse transcription of RNA extracted from heart and lung endothelial cells (30 cycles of amplification).

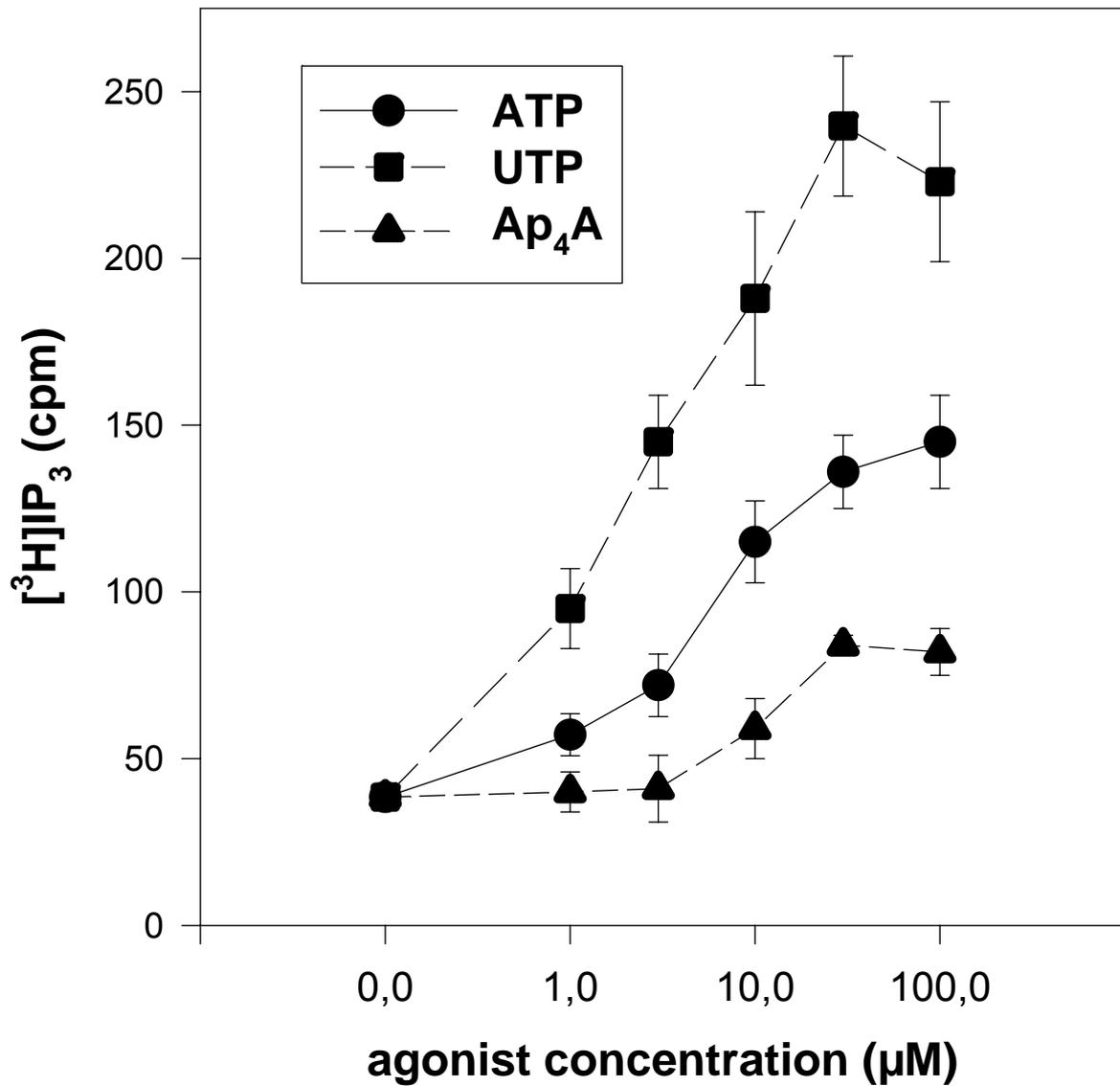


Figure 6: Effect of extracellular nucleotides on inositol triphosphates accumulation in primary endothelial cells isolated from P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} hearts.

A: Concentration-action curves of UTP, ATP and Ap₄A on inositol triphosphates accumulation in primary endothelial cells isolated from P2Y₄^{0/+} heart.

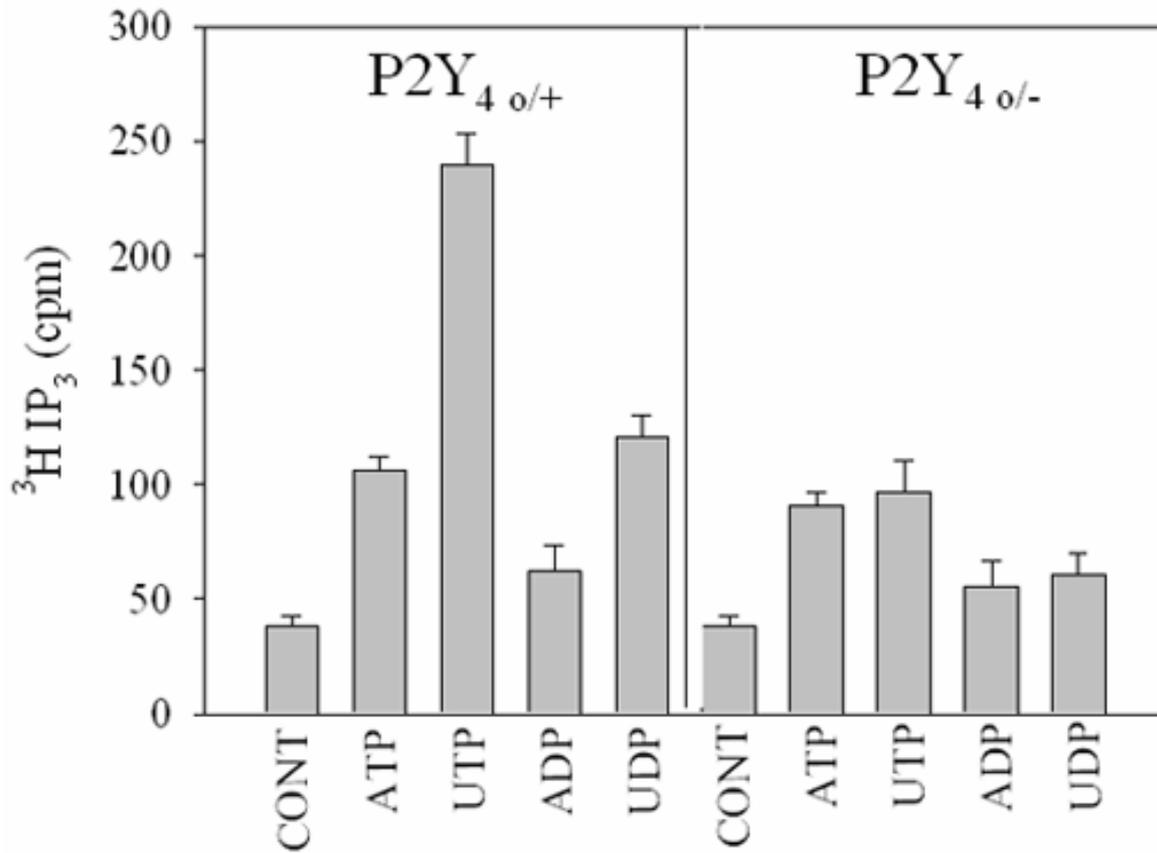


Figure 6: Effect of extracellular nucleotides on inositol triphosphates accumulation in primary endothelial cells isolated from P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} hearts.

B: Effect of ATP, UTP, ADP or UDP (100 μM each) on inositol triphosphates accumulation in primary endothelial cells isolated from P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} heart.

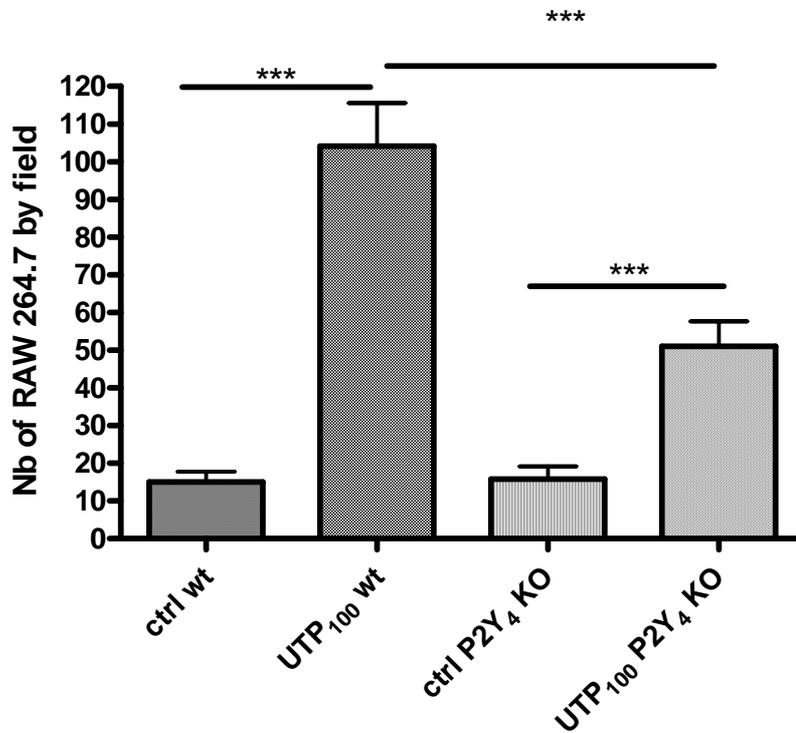


Figure 7: Adhesion of RAW 264.7 macrophages on primary endothelial cells isolated from P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} hearts. P2Y₄^{0/+} and P2Y₄^{0/-} endothelial cells were stimulated or not during 24 h with UTP 100 μ M. RAW 264.7 macrophages labeled during 2 h with calcein (10 μ g/mL) were then incubated at $5 \cdot 10^5$ per dish during 2 hours on the unstimulated and UTP-stimulated endothelial cells. The dishes were rinsed twice with PBS. The number of adherent macrophages was quantified in 15 different fields per experimental point. The data are mean \pm s.e.m. of experimental points obtained for 8 P2Y₄^{0/+} and 8 P2Y₄^{0/-} mice.

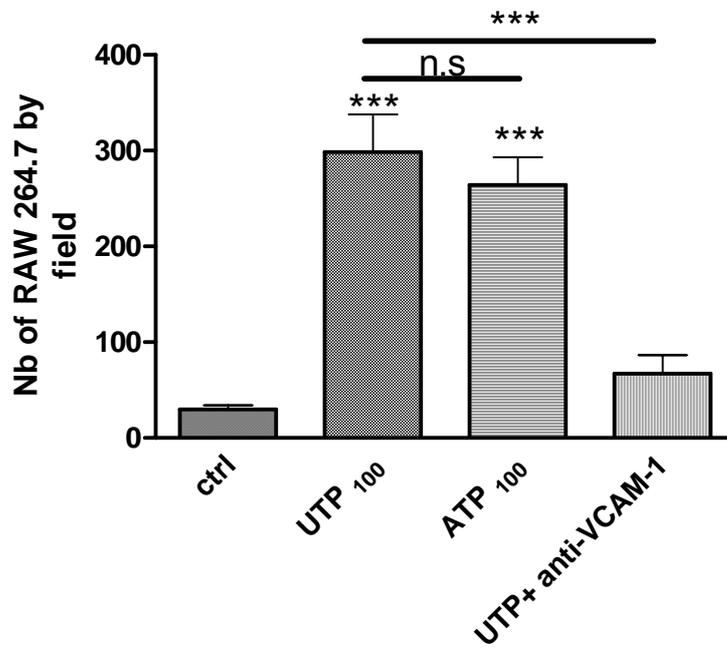


Figure 8: Involvement of VCAM-1 in UTP-induced adhesion of RAW 264.7 macrophages on primary endothelial cells. P2Y₄^{0/+} primary endothelial cells were stimulated or not during 24 h with UTP (100 μM) or ATP (100 μM). An anti-VCAM-1 blocking antibody (5 mg/mL) was added or not during the last 3 hours of stimulation with UTP. RAW 264.7 macrophages labeled during 2 h with calcein (10 μg/mL) were then incubated at 5.10⁵ per dish during 2 h on the primary endothelial cells. The number of adherent macrophages was quantified in 15 different fields per experimental point. The data are mean ± s.e.m. of experimental points obtained for 4 P2Y₄^{0/+} and 4 P2Y₄^{0/-} mice.

Annexe 2:

A high concentration of ADP induces weak platelet granule secretion independently of aggregation and thromboxane A₂ production

Nicolas Lantz, Béatrice Hechler, Catherine Ravanat, Jean-Pierre Cazenave, Christian Gachet.

Lettre à l'éditeur soumise au journal *Thrombosis and Haemostasis*.

INSERM U.311, Strasbourg, France; EFS-Alsace, Strasbourg, France; Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Correspondence to: Dr. Christian GACHET
INSERM U.311
Etablissement Français du Sang-Alsace
10 rue Spielmann, BP N° 36
67065 Strasbourg Cedex, France
Tel: (33) 388 21 25 25, ext. 6323
Fax: (33) 388 21 25 21
Email: christian.gachet@efs-alsace.fr

Adenosine 5'-diphosphate (ADP) is a weak platelet agonist which induces reversible aggregation without secretion of the granule contents in a medium containing physiological concentrations of calcium (mM) (Packham, Bryant et al. 1989; Cattaneo, Gachet et al. 2002). In contrast, under conditions where the external calcium concentration is decreased to micromolar levels, as in citrated platelet-rich plasma (cPRP), ADP artifactually induces irreversible secondary aggregation with release of the granule contents due to thromboxane A₂ (TxA₂) synthesis (Mustard, Perry et al. 1975; Packham, Kinlough-Rathbone et al. 1987; Packham, Bryant et al. 1989). However, ADP has also been shown to induce aspirin-insensitive exposure of the alpha granule marker P-selectin (CD62P) in the absence of serotonin (5-HT) release (Rand, Perry et al. 1996), suggesting that alpha and dense granule secretion follow separate pathways. The aims of our study were to assess i) whether ADP can induce CD62P exposure in a calcium-containing medium, independently of TxA₂ formation and aggregation and ii) whether CD62P exposure is a reliable marker of overall granule release.

The study was conducted in citrated (3.8%) platelet-rich plasma (cPRP) and in washed platelets resuspended in Tyrode's buffer containing a physiological concentration of calcium (Cazenave, Ohlmann et al. 2004). Platelets were incubated under stirring condition with increasing concentrations of ADP (1, 5 or 100 μM) (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, France) or vehicle (plain Tyrode's buffer, PT) for 3 min at 37°C and processed immediately for determination of their alpha and dense granule release. Two methods were used to evaluate alpha granule release: measurement of platelet factor 4 (PF4) in the supernatant of pelleted platelet samples by ELISA (Asserachrom, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) and measurement of P-selectin exposure by flow cytometry using a phycoerythrin-conjugated mouse anti-human CD62P antibody (Beckman Coulter, Roissy, France). Dense granule release was evaluated by measurement of serotonin secretion in platelets loaded with [³H]-5-

HT (Cazenave, Ohlmann et al. 2004), in the presence of imipramine (5 μ M) to inhibit 5-HT reuptake (Rand, Perry et al. 1996). In some experiments, the platelets were incubated with 1 mM aspirin (ASA) to inhibit TxA₂ synthesis, or with the anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ antibody abciximab (20 μ g/mL) to prevent aggregation (Eli-Lilly, Centocor, Leiden, The Netherlands).

In washed human platelets, in the presence of a physiological concentration of calcium, ADP induced a concentration-dependent increase in alpha granule secretion as measured by PF4 release (6.1 \pm 1.7 % for 100 μ M ADP vs 1.5 \pm 0.1 % for PT) and in [³H]-5-HT release from dense granules (1.8 \pm 0.7 % for 100 μ M ADP vs 0.6 \pm 0.6 % for PT) (Table 1). This release reaction was insensitive to aspirin (PF4: 5.1 \pm 4.3 % for 100 μ M ADP vs 1.7 \pm 0.3 % for PT; [³H]-5-HT: 2.9 \pm 1.1 % for 100 μ M ADP vs 1 \pm 1.2 % for PT) or abciximab treatment (PF4: 7.5 \pm 1 % for 100 μ M ADP vs 1.7 \pm 0.2 % for PT; CD62P: 15.1 \pm 2.5 MFI for 100 μ M ADP vs 2.2 \pm 0.1 MFI for PT; [³H]-5-HT: 2.2 \pm 0.4 % for 100 μ M ADP vs 0.3 \pm 0.1 % for PT), indicating that it was independent of TxA₂ synthesis and aggregate formation (Table 1). The release reaction induced by ADP (100 μ M) nevertheless remained weak as compared to that induced by stimulation of the protease-activated receptor 1 (PAR-1) with 50 μ M SFLLRN (TRAP) (PF4: 28.8 \pm 3.4 %; CD62P: 90.6 \pm 5.6 MFI; [³H]-5-HT: 98 \pm 1.5 %).

In human cPRP, under aggregating conditions ADP induced the expected strong release of PF4 (93.5 \pm 20 % for 100 μ M ADP vs 1.7 \pm 0.1 % for PT) and [³H]-5-HT (76.1 \pm 7 % for 100 μ M ADP vs 0.5 \pm 0.4 % for PT). This response was dramatically reduced in the presence of aspirin or abciximab (Table 1), confirming that it was dependent to a large extent on both platelet aggregation and TxA₂ synthesis. However, part of the release reaction induced by ADP was independent of TxA₂ synthesis and aggregation, since there remained a residual concentration-dependent increase in alpha and dense granule secretion in the presence of aspirin and abciximab (PF4: 22.6 \pm 3 % for 100 μ M ADP vs 1.6 \pm 0.5 % for PT; CD62P: 26.8 \pm 1.6 MFI for 100 μ M ADP vs 2.6 \pm 0.1 MFI for PT; [³H]-5-HT: 7.3 \pm 0.6 % for

100 μ M ADP vs 0.2 ± 0.3 % for PT). This residual ADP-induced release reaction was stronger as compared to the secretion induced by ADP in washed platelets (Table 1), although it remained weak as compared to that induced by stimulation of the PAR-1 receptor with 50 μ M SFLLRN (TRAP) (CD62P: 63 ± 3.6 MFI; PF4: 76.5 ± 10 %; [3 H]-5-HT: 98 ± 2 %). Finally, MRS2179 (100 μ M) and AR-C69931MX (10 μ M), two selective antagonists of the P2Y₁ receptor and P2Y₁₂ receptor, respectively, inhibited the exposure of CD62P and secretion of PF4 and [3 H]-5-HT triggered by ADP (Table 1), demonstrating that the P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors both contribute to the ADP-induced release reaction.

Altogether, we showed in this work that ADP is able to induce weak release of the alpha and dense granule contents in a calcium-containing medium, independently of platelet aggregation and TxA₂ synthesis, thus confirming previous work (Rand, Perry et al. 1996) and somehow balancing the dogma of the inability of ADP to induce platelet secretion. The P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors are both involved in this process. The weak level of secretion induced by ADP as compared to other agonists might be related to the level of P2Y₁ receptor expression, since we have shown that transgenic mice overexpressing the P2Y₁ receptor specifically in the platelet lineage display increased aggregation in response to ADP and a full secretion reaction (Hechler, Zhang et al. 2003). Although the release of alpha granule contents was always concomitant to that of dense granule contents, 5-HT release was very weak as compared to PF4 release. Whether this was due to the sensitivity of the detection methods or to the alpha/dense granule ratio remains an open question. In any case, our results suggest that ADP does not induce separate pathways of alpha and dense granule secretion and that CD62P exposure is a reliable marker of overall granule release.

REFERENCES

1. Cattaneo M, Gachet C, Cazenave JP, et al. Adenosine diphosphate(ADP) does not induce thromboxane A2 generation in human platelets. *Blood* 2002 May 15;99(10):3868-3869; author reply 3869-3870.
2. Packham MA, Bryant NL, Guccione MA, et al. Effect of the concentration of Ca²⁺ in the suspending medium on the responses of human and rabbit platelets to aggregating agents. *Thromb Haemost* 1989;62(3):968-976.
3. Mustard JF, Perry DW, Kinlough-Rathbone RL, et al. Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. *Am J Physiol* 1975 Jun;228(6):1757-1765.
4. Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Thromboxane A2 causes feedback amplification involving extensive thromboxane A2 formation on close contact of human platelets in media with a low concentration of ionized calcium. *Blood* 1987 Sep;70(3):647-651.
5. Rand ML, Perry DW, Packham MA, et al. Conditions influencing release of granule contents from human platelets in citrated plasma induced by ADP or the thrombin receptor activating peptide SFLLRN: direct measurement of percent release of beta- thromboglobulin and assessment by flow cytometry of P-selectin expression. *Am J Hematol* 1996;52(4):288-294.
6. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, et al. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* 2004;272:13-28.
7. Hechler B, Zhang Y, Eckly A, et al. Lineage-specific overexpression of the P2Y1 receptor induces platelet hyper-reactivity in transgenic mice. *J Thromb Haemost* 2003 Jan;1(1):155-163.

LEGEND TO THE TABLE

Table 1: Alpha and dense granule release of human platelets in response to ADP

Aliquots of human cPRP or washed platelets resuspended at 3×10^5 cells/ μL in Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 0.3 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.3) containing 2 mM CaCl_2 , 0.35% human serum albumin and 0.02 U/mL apyrase were incubated with ADP (1, 5 or 100 μM) or vehicle (plain Tyrode's buffer, PT) for 3 min at 37°C. Platelet samples were then processed for measurement of the dense granule secretion ($[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ release) and alpha granule secretion (PF4 release and CD62P exposure). CD62P exposure was determined only under non aggregating conditions (in the presence of abciximab) and CD62P values represent the mean fluorescence intensity (MFI) (mean \pm SEM). A PE-conjugated isotype (BD Biosciences) was used to quantify the background labeling which was subtracted from the specific signal. PF4 values represent the percentage of the total alpha granule content (determined in total platelet lysates) and $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ values the percentage of the total dense granule content. n = 3 - 6; nd: not determined. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (one way Anova test, followed by a Dunnett post-test).

		ADP (μM)	PF4 (% of total alpha granule content)					PE CD62P (MFI)					5-HT (% of total dense granule content)				
			PT	1	5	100	TRAP 50	PT	1	5	100	TRAP 50	PT	1	5	100	TRAP 50
Human cPRP	-Abciximab	-ASA	1.7±0.1	31.4±2.6	32±1.5	93.5±20**	99.9±5	x	x	x	x	x	0.5±0.4	68±7.8**	74±4.3**	76.1±7**	100
		+ASA	1.5±0.7	2.5±0.8	10.9±1.6**	15.3±3.8**	92.1±14	x	x	x	x	x	0.3±0.1	0.2±0.2	3±1.7	2±0.7	95±3
	+Abciximab	-ASA	1.2±0.1	1.4±0.7	10±1.5	28.7±9**	99.9±12	2.5±0.1	5.2±0.7	16±2.2	28.8±4.3**	64.8±3.3	0.1±0.1	0.6±0.6	2±0.4	5.2±1.5**	100
		+ASA	1.6±0.5	2.6±0.4	11.7±1.5	22.6±3**	76.5±10	2.6±0.1	6.4±1.4	18.4±1.3**	26.8±1.6**	63±3.6	0.2±0.3	3.1±2.3	4.8±1.6	7.3±0.6*	98±2
		+MRS	x	1.5±0.8	3.5±0.6**	22.5±1.4**	92.5±5.5	x	3.2±0.4	3.6±0.3**	10.7±1.6**	63.1±3.6	x	0.8±0.2	1±0.1	0.8±0.1*	nd
		+ARC	x	0.7±0.2	2.4±0.2**	7.3±0.5**	83±4.3	x	3.4±0.3	4.1±0.1**	5.7±0.2**	52.7±3.6	x	0.6±0.2	0.5±0.3	0.9±0.2*	nd
		+MRS+ARC	x	0.6±0.2	2.2±0.6**	6.9±0.3**	74.2±5.1	x	3.6±0.3	4±0.3**	5.2±0.3**	57±5.1	x	0.8±0.4	0.7±0.3	0.6±0.1*	nd
Washed human platelets	-Abciximab	-ASA	1.5±0.1	1.7±0.7	2.2±0.6	6.1±1.7**	32.2±1.4	x	x	x	x	x	0.6±0.6	0.9±0.1	1.1±0.5	1.8±0.7	82.7±5.8
		+ASA	1.7±0.3	1.9±0.3	2.3±0.3	5.1±4.3**	30.3±2.1	x	x	x	x	x	1±1.2	2.1±0.7	2.3±0.7	2.9±1.1	77.7±6.3
	+Abciximab	-ASA	1.7±0.2	1.8±0.8	2.9±0.6	7.5±1**	28.8±3.4	2.2±0.1	4.3±0.5	8.4±1.4*	15.1±2.5**	90.6±5.6	0.3±0.1	0.6±0.1	1.2±0.1*	2.2±0.4**	98±1.5
		+ASA	1.9±0.1	2.6±0.5	2.8±0.2	6.6±1.4	31.9±1.7	2.2±1.7	3.7±0.1	6.8±0.7	14.6±2.8**	85.7±4	0.5±0.2	0.7±0.4	1.2±0.2	2.3±0.3**	97.5±1.7

Table 1

V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbracchio, M. P., J. M. Boeynaems, et al. (2003). "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family." Trends Pharmacol Sci 24(2): 52-5.
- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?" Pharmacol Ther 64(3): 445-75.
- Abbracchio, M. P., G. Burnstock, et al. (2006). "International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy." Pharmacol Rev 58: 281-341.
- Aird, W. C. (2003). "Endothelial cell heterogeneity." Crit Care Med 31(4 Suppl): S221-30.
- Andre, P., S. M. Delaney, et al. (2003). "P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries." J Clin Invest 112(3): 398-406.
- Augustin, H. G., D. H. Kozian, et al. (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." Bioessays 16(12): 901-6.
- Balconi, G., R. Spagnuolo, et al. (2000). "Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: A tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(6): 1443-51.
- Baurand, A. and C. Gachet (2003). "The P2Y₁ receptor as a target for new antithrombotic drugs: a review of the P2Y₁ antagonist MRS-2179." Cardiovasc Drug Rev 21(1): 67-76.
- Bean, B. P. (1992). "Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels." Trends Pharmacol Sci 13(3): 87-90.
- Benelli, R., M. Morini, et al. (2002). "Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation." Faseb J 16(2): 267-9.
- Berger, G., D. W. Hartwell, et al. (1998). "P-Selectin and platelet clearance." Blood 92(11): 4446-52.
- Birch, K. A., B. M. Ewenstein, et al. (1994). "Prolonged peak elevations in cytoplasmic free calcium ions, derived from intracellular stores, correlate with the extent of thrombin-stimulated exocytosis in single human umbilical vein endothelial cells." J Cell Physiol 160(3): 545-54.
- Birch, K. A., J. S. Pober, et al. (1992). "Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells." J Cell Biol 118(6): 1501-10.
- Bird, I. N., V. Taylor, et al. (1999). "Homophilic PECAM-1(CD31) interactions prevent endothelial cell apoptosis but do not support cell spreading or migration." J Cell Sci 112 (Pt 12): 1989-97.
- Boarder, M. R. and S. M. Hourani (1998). "The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors." Trends Pharmacol Sci 19(3): 99-107.
- Bodin, P., D. Bailey, et al. (1991). "Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells." Br J Pharmacol 103(1): 1203-5.
- Boeynaems, J. M., D. Communi, et al. (2005). "Overview of the P2 receptors." Semin Thromb Hemost 31(2): 139-49.

- Boeynaems, J. M. and J. D. Pearson (1990). "P2 purinoceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms." Trends Pharmacol Sci 11(1): 34-7.
- Bogdanov, Y. D., S. S. Wildman, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor." Br J Pharmacol 124(3): 428-30.
- Broide, D. H., D. Humber, et al. (1998). "Inhibition of eosinophil rolling and recruitment in P-selectin- and intracellular adhesion molecule-1-deficient mice." Blood 91(8): 2847-56.
- Browder, T., J. Folkman, et al. (2000). "The hemostatic system as a regulator of angiogenesis." J Biol Chem 275(3): 1521-4.
- Broze, G. J., Jr. (1995). "Tissue factor pathway inhibitor." Thromb Haemost 74(1): 90-3.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." Pharmacol Rev 24(3): 509-81.
- Burnstock, G. (1978). "A basis for distinguishing two types of purinergetic receptor. Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. Straub, Bolis (éd). Raven, New-York, p. 107-118."
- Burnstock, G. (2002). "Purinergetic signaling and vascular cell proliferation and death." Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(3): 364-73.
- Bussolino, F., M. De Rossi, et al. (1991). "Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines." J Immunol 147(7): 2122-9.
- Cambien, B. and D. D. Wagner (2004). "A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin." Trends Mol Med 10(4): 179-86.
- Cao, Y., R. W. Ji, et al. (1996). "Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells." J Biol Chem 271(46): 29461-7.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med 6(4): 389-95.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med 9(6): 653-60.
- Carter, T. D., T. J. Hallam, et al. (1988). "Regulation of P2y-purinoceptor-mediated prostacyclin release from human endothelial cells by cytoplasmic calcium concentration." Br J Pharmacol 95(4): 1181-90.
- Cassoni, P., T. Marrocco, et al. (2006). "Oxytocin induces proliferation and migration in immortalized human dermal microvascular endothelial cells and human breast tumor-derived endothelial cells." Mol Cancer Res 4(6): 351-9.
- Castro, E., A. R. Tome, et al. (1994). "Single-cell fura-2 microfluorometry reveals different purinoceptor subtypes coupled to Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells." Pflugers Arch 426(6): 524-33.
- Cattaneo, M., C. Gachet, et al. (2002). "Adenosine diphosphate(ADP) does not induce thromboxane A2 generation in human platelets." Blood 99(10): 3868-9; author reply 3869-70.
- Cattaneo, M., A. Lecchi, et al. (2004). "Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y(1) receptor." Biochem Pharmacol 68(10): 1995-2002.
- Cazenave, J. P., P. Ohlmann, et al. (2004). "Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood." Methods Mol Biol 272: 13-28.
- Cernuda-Morollon, E. and A. J. Ridley (2006). "Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells." Circ Res 98(6): 757-67.

- Cesarman-Maus, G. and K. A. Hajjar (2005). "Molecular mechanisms of fibrinolysis." Br J Haematol 129(3): 307-21.
- Cha, S. H., T. W. Hahn, et al. (2000). "Purinoreceptor-mediated calcium mobilization and cellular proliferation in cultured bovine corneal endothelial cells." Jpn J Pharmacol 82(3): 181-7.
- Chaulet, H., C. Desgranges, et al. (2001). "Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin." Circ Res 89(9): 772-8.
- Chen, M. and J. G. Geng (2006). "P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 54(2): 75-84.
- Cines, D. B., E. S. Pollak, et al. (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." Blood 91(10): 3527-61.
- Coleman, R. A., W. L. Smith, et al. (1994). "International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes." Pharmacol Rev 46(2): 205-29.
- Collins, T., M. A. Read, et al. (1995). "Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers." Faseb J 9(10): 899-909.
- Colman, R. W., B. A. Jameson, et al. (2000). "Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis." Blood 95(2): 543-50.
- Communi, D., R. Janssens, et al. (2000). "Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors." Cell Signal 12(6): 351-60.
- Communi, D., P. Paindavoine, et al. (1999). "Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung." Br J Pharmacol 127(2): 562-8.
- Communi, D., S. Piroton, et al. (1995). "Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor." J Biol Chem 270(52): 30849-52.
- Communi, D., E. Raspe, et al. (1995). "Coexpression of P2Y and P2U receptors on aortic endothelial cells. Comparison of cell localization and signaling pathways." Circ Res 76(2): 191-8.
- Communi, D., B. Robaye, et al. (1999). "Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor." Br J Pharmacol 128(6): 1199-206.
- Condeelis, J. and J. W. Pollard (2006). "Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis." Cell 124(2): 263-6.
- Contrino, J., G. Hair, et al. (1996). "In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease." Nat Med 2(2): 209-15.
- Conway, E. M., D. Collen, et al. (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." Cardiovasc Res 49(3): 507-21.
- Crawford, K. M., D. K. MacCallum, et al. (1993). "Agonist-induced Ca²⁺ mobilization in cultured bovine and human corneal endothelial cells." Curr Eye Res 12(4): 303-11.
- Cybulsky, M. I., K. Iiyama, et al. (2001). "A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis." J Clin Invest 107(10): 1255-62.
- Datta, Y. H., M. Romano, et al. (1995). "Peptido-leukotrienes are potent agonists of von Willebrand factor secretion and P-selectin surface expression in human umbilical vein endothelial cells." Circulation 92(11): 3304-11.

- Dawicki, D. D., D. Chatterjee, et al. (1997). "Extracellular ATP and adenosine cause apoptosis of pulmonary artery endothelial cells." Am J Physiol 273(2 Pt 1): L485-94.
- de Fougerolles, A. R. and T. A. Springer (1992). "Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes." J Exp Med 175(1): 185-90.
- de Fougerolles, A. R., S. A. Stacker, et al. (1991). "Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1." J Exp Med 174(1): 253-67.
- De La Cruz, P., M. Arrebola, et al. (2003). "Effects of clopidogrel and ticlopidine on experimental diabetic ischemic retinopathy in rats." Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol 367(2): 204-10.
- Defreyn, G., C. Gachet, et al. (1991). "Ticlopidine and clopidogrel (SR 25990C) selectively neutralize ADP inhibition of PGE1-activated platelet adenylate cyclase in rats and rabbits." Thromb Haemost 65(2): 186-90.
- Dejana, E. (2004). "Endothelial cell-cell junctions: happy together." Nat Rev Mol Cell Biol 5(4): 261-70.
- Dejana, E. (2006). "The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis." Nat Cell Biol 8(2): 105-7.
- DeLisser, H. M., M. Christofidou-Solomidou, et al. (1997). "Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis." Am J Pathol 151(3): 671-7.
- Di Virgilio, F. and A. Solini (2002). "P2 receptors: new potential players in atherosclerosis." Br J Pharmacol 135(4): 831-42.
- Diacovo, T. G., A. R. deFougerolles, et al. (1994). "A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2." J Clin Invest 94(3): 1243-51.
- Distler, J. H., A. Hirth, et al. (2003). "Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis." Q J Nucl Med 47(3): 149-61.
- Dong, Q. G., S. Bernasconi, et al. (1997). "A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants." Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(8): 1599-604.
- Drury, A. N. and A. Szent-Györgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart." J Physiol 68: 213-237.
- Duchene, A. D. and K. Takeda (1997). "P2Y- and P2U-mediated increases in internal calcium in single bovine aortic endothelial cells in primary culture." Endothelium 5(4): 277-86.
- Edgington, T. S., C. D. Dickinson, et al. (1997). "The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation." Thromb Haemost 78(1): 401-5.
- Egami, K., T. Murohara, et al. (2006). "Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin." J Leukoc Biol 79(5): 971-6.
- Engelhardt, B. and H. Wolburg (2004). "Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?" Eur J Immunol 34(11): 2955-63.
- Enjyoji, K., J. Sevigny, et al. (1999). "Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation." Nat Med 5(9): 1010-7.
- Erlinge, D. (1998). "Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells." Gen Pharmacol 31(1): 1-8.

- Esmon, C. T. and K. Fukudome (1995). "Cellular regulation of the protein C pathway." Semin Cell Biol 6(5): 259-68.
- Fair, D. S., R. A. Marlar, et al. (1986). "Human endothelial cells synthesize protein S." Blood 67(4): 1168-71.
- Favaloro, E. J. (1993). "Differential expression of surface antigens on activated endothelium." Immunol Cell Biol 71 (Pt 6): 571-81.
- Ferrara, N. and K. Alitalo (1999). "Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors." Nat Med 5(12): 1359-64.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med 1(1): 27-31.
- Foster, C. J., D. M. Prosser, et al. (2001). "Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs." J Clin Invest 107(12): 1591-8.
- Freed, E. O. and A. J. Mouland (2006). "The cell biology of HIV-1 and other retroviruses." Retrovirology 3: 77.
- Furie, B., B. C. Furie, et al. (2001). "A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion." Thromb Haemost 86(1): 214-21.
- Gachet, C. (2001). "ADP receptors of platelets and their inhibition." Thromb Haemost 86(1): 222-32.
- Gachet, C. (2006). "Regulation of platelet functions by P2 receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol 46: 277-300.
- Gachet, C., M. Cattaneo, et al. (1995). "Purinoreceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors." Br J Haematol 91(2): 434-44.
- Gale, N. W. and G. D. Yancopoulos (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." Genes Dev 13(9): 1055-66.
- Galley, H. F. and N. R. Webster (2004). "Physiology of the endothelium." Br J Anaesth 93(1): 105-13.
- Graud, J. C. and G. Roussel Techniques immunocytochimiques sur coupes de tissus et cultures cellulaires Microscopie photonique et électronique, Département d'Education Permanente de l'ULP Strasbourg I.
- Garg, U. C. and A. Hassid (1989). "Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells." J Clin Invest 83(5): 1774-7.
- Garlanda, C., C. Parravicini, et al. (1994). "Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 91(15): 7291-5.
- Gebb, S. and T. Stevens (2004). "On lung endothelial cell heterogeneity." Microvasc Res 68(1): 1-12.
- Gendaszewska-Darmach, E., M. Maszewska, et al. (2003). "Degradation of extracellular nucleotides and their analogs in HeLa and HUVEC cell cultures." Acta Biochim Pol 50(4): 973-84.
- Glass, R. and G. Burnstock (2001). "Immunohistochemical identification of cells expressing ATP-gated cation channels (P2X receptors) in the adult rat thyroid." J Anat 198(Pt 5): 569-79.
- Goepfert, C., M. Imai, et al. (2000). "CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis." Mol Med 6(7): 591-603.

- Goepfert, C., C. Sundberg, et al. (2001). "Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice." Circulation 104(25): 3109-15.
- Gospodarowicz, D. and J. Cheng (1986). "Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation." J Cell Physiol 128(3): 475-84.
- Govers, R. and T. J. Rabelink (2001). "Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase." Am J Physiol Renal Physiol 280(2): F193-206.
- Graham, A., A. McLees, et al. (1996). "Stimulation by the nucleotides, ATP and UTP of mitogen-activated protein kinase in EAhy 926 endothelial cells." Br J Pharmacol 117(6): 1341-7.
- Gross, P. L. and W. C. Aird (2000). "The endothelium and thrombosis." Semin Thromb Hemost 26(5): 463-78.
- Guns, P. J., A. Korda, et al. (2005). "Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta." Br J Pharmacol.
- Hafezi-Moghadam, A., K. L. Thomas, et al. (2001). "L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment." J Exp Med 193(7): 863-72.
- Haines, W. R., G. E. Torres, et al. (1999). "Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms." Mol Pharmacol 56(4): 720-7.
- Hamilton, K. K. and P. J. Sims (1987). "Changes in cytosolic Ca²⁺ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1." J Clin Invest 79(2): 600-8.
- Hanahan, D. (1998). "A flanking attack on cancer." Nat Med 4(1): 13-4.
- Hansen, M. A., J. L. Dutton, et al. (1999). "P2X (purinergic) receptor distributions in rat blood vessels." J Auton Nerv Syst 75(2-3): 147-55.
- Hansmann, G., R. Bultmann, et al. (1997). "Characterization by antagonists of P2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 356(5): 641-52.
- Hatakeyama, K., Y. Asada, et al. (1997). "Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions." Atherosclerosis 133(2): 213-9.
- Hechler, B., A. Eckly, et al. (1998). "The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel." Br J Haematol 103(3): 858-66.
- Hechler, B., C. Nonne, et al. (2006). "MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice." J Pharmacol Exp Ther 316(2): 556-63.
- Hechler, B., Y. Zhang, et al. (2003). "Lineage-specific overexpression of the P2Y1 receptor induces platelet hyper-reactivity in transgenic mice." J Thromb Haemost 1(1): 155-63.
- Herauld, J. P., F. Dol, et al. (1999). "Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat." Thromb Haemost 81(6): 957-60.
- Hirsch, S. and S. Gordon (1983). "Polymorphic expression of a neutrophil differentiation antigen revealed by monoclonal antibody 7/4." Immunogenetics 18(3): 229-39.
- Hollopeter, G., H. M. Jantzen, et al. (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." Nature 409(6817): 202-7.
- Huang, H., J. McIntosh, et al. (2003). "An efficient, nonenzymatic method for isolation and culture of murine aortic endothelial cells and their response to inflammatory stimuli." In Vitro Cell Dev Biol Anim 39(1-2): 43-50.

- Hubbard, A. K. and R. Rothlein (2000). "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades." Free Radic Biol Med 28(9): 1379-86.
- Ichaso, N. and S. M. Dilworth (2001). "Cell transformation by the middle T-antigen of polyoma virus." Oncogene 20(54): 7908-16.
- Imhof, B. A., B. Engelhardt, et al. (2001). "Novel mechanisms of the transendothelial migration of leukocytes." Trends Immunol 22(8): 411-4.
- Jackson, D. E. (2003). "The unfolding tale of PECAM-1." FEBS Lett 540(1-3): 7-14.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, et al. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest 52(11): 2745-56.
- Jain, R. K., K. Schlenger, et al. (1997). "Quantitative angiogenesis assays: progress and problems." Nat Med 3(11): 1203-8.
- Jawien, J., G. Csanyi, et al. (2007). "Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice." Eur J Pharmacol 556(1-3): 129-35.
- Jin, J., V. R. Dasari, et al. (1998). "Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells." Br J Pharmacol 123(5): 789-94.
- Kaczmarek, E., L. Erb, et al. (2005). "Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways." Thromb Haemost 93(4): 735-42.
- Kaczmarek, E., K. Koziak, et al. (1996). "Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase." J Biol Chem 271(51): 33116-22.
- Kaiser, R. A. and I. L. Buxton (2002). "Nucleotide-mediated relaxation in guinea-pig aorta: selective inhibition by MRS2179." Br J Pharmacol 135(2): 537-45.
- Kaiser, R. A., B. C. Oxhorn, et al. (2002). "Functional compartmentation of endothelial P2Y receptor signaling." Circ Res 91(4): 292-9.
- Kansas, G. S., G. S. Wood, et al. (1991). "Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes." J Immunol 146(7): 2235-44.
- Kauffmanstein, G., B. Hechler, et al. (2004). "Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor." J Thromb Haemost 2(11): 1980-8.
- Kawashima, Y., T. Nagasawa, et al. (2000). "Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells." Blood 96(6): 2157-62.
- Kennedy, C. (2000). "The discovery and development of P2 receptor subtypes." J Auton Nerv Syst 81(1-3): 158-63.
- Kevil, C. G. (2003). "Endothelial cell activation in inflammation: lessons from mutant mouse models." Pathophysiology 9(2): 63-74.
- Kevil, C. G., R. P. Patel, et al. (2001). "Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol 281(5): C1442-7.
- Kisucka, J., C. E. Butterfield, et al. (2006). "Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage." Proc Natl Acad Sci U S A 103(4): 855-60.
- Kittel, A., Z. S. Csapo, et al. (2004). "Co-localization of P2Y1 receptor and NTPDase1/CD39 within caveolae in human placenta." Eur J Histochem 48(3): 253-9.
- Kittel, A., E. Kaczmarek, et al. (1999). "CD39 as a caveolar-associated ectonucleotidase." Biochem Biophys Res Commun 262(3): 596-9.

- Klein-Soyer, C., A. Beretz, et al. (1986). "A simple in vitro model of mechanical injury of confluent cultured endothelial cells to study quantitatively the repair process." Thromb Haemost 56(2): 232-5.
- Klein-Soyer, C., J. Ceraline, et al. (1997). "Angiogenesis inhibitor SR 25989 upregulates thrombospondin-1 expression in human vascular endothelial cells and foreskin fibroblasts." Biol Cell 89(4): 295-307.
- Kunapuli, S. P. and J. L. Daniel (1998). "P2 receptor subtypes in the cardiovascular system." Biochem J 336 (Pt 3): 513-23.
- Kunapuli, S. P., Z. Ding, et al. (2003). "ADP receptors--targets for developing antithrombotic agents." Curr Pharm Des 9(28): 2303-16.
- Kwee, L., D. K. Burns, et al. (1995). "Creation and characterization of E-selectin- and VCAM-1-deficient mice." Ciba Found Symp 189: 17-28; discussion 28-34, 77-8.
- Laitinen, L. (1987). "Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues." Histochem J 19(4): 225-34.
- Lambertsen, C. J., P. L. Bunce, et al. (1952). "Relationship of oxygen tension to hemoglobin oxygen saturation in the arterial blood of normal men." J Appl Physiol 4(12): 873-85.
- Lazarowski, E. R., R. C. Boucher, et al. (2003). "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." Mol Pharmacol 64(4): 785-95.
- Lazarowski, E. R., L. G. Rochelle, et al. (2001). "Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder." J Pharmacol Exp Ther 297(1): 43-9.
- Lebedeva, T., M. L. Dustin, et al. (2005). "ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation." Curr Opin Immunol 17(3): 251-8.
- Lee, O. H., Y. M. Kim, et al. (1999). "Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun 264(3): 743-50.
- Leeuwenberg, J. F., E. F. Smeets, et al. (1992). "E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro." Immunology 77(4): 543-9.
- Léon, C., M. Alex, et al. (2004). "Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation." Blood 103(2): 594-600.
- Léon, C., M. Freund, et al. (2001). "Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist." Circulation 103(5): 718-23.
- Léon, C., B. Hechler, et al. (1999). "Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice." J Clin Invest 104(12): 1731-7.
- Leon, C., B. Hechler, et al. (1997). "The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells." FEBS Lett 403(1): 26-30.
- Léon, C., C. Ravanat, et al. (2003). "Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(10): 1941-7.
- Léon, C., C. Vial, et al. (1996). "Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor." Gene 171(2): 295-7.
- Levin, E. R. (1995). "Endothelins." N Engl J Med 333(6): 356-63.

- Ley, K. (2003). "The role of selectins in inflammation and disease." Trends Mol Med 9(6): 263-8.
- Li, Y. M., G. Baviello, et al. (1997). "Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages." J Immunol Methods 201(2): 183-8.
- Loesch, A. and G. Burnstock (2000). "Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in vascular endothelial cells in rat brain." Endothelium 7(2): 93-8.
- Loscalzo, J. and G. Welch (1995). "Nitric oxide and its role in the cardiovascular system." Prog Cardiovasc Dis 38(2): 87-104.
- Lustig, K. D., A. K. Shiau, et al. (1993). "Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A 90(11): 5113-7.
- Luttrell, L. M. (2003). "'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors." J Mol Endocrinol 30(2): 117-26.
- Maciag, T., J. Kadish, et al. (1982). "Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells." J Cell Biol 94(3): 511-20.
- MacKenzie, K. L., S. Franco, et al. (2002). "Multiple stages of malignant transformation of human endothelial cells modelled by co-expression of telomerase reverse transcriptase, SV40 T antigen and oncogenic N-ras." Oncogene 21(27): 4200-11.
- Mackman, N. (2004). "Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(6): 1015-22.
- Mah-Becherel, M. C., J. Ceraline, et al. (2002). "Anti-angiogenic effects of the thienopyridine SR 25989 in vitro and in vivo in a murine pulmonary metastasis model." Br J Cancer 86(5): 803-10.
- Malam-Souley, R., C. Seye, et al. (1996). "Nucleotide receptor P2u partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells." J Cell Physiol 166(1): 57-65.
- Maliszewski, C. R., G. J. Delespesse, et al. (1994). "The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization." J Immunol 153(8): 3574-83.
- Mallat, Z. and A. Tedgui (2000). "Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance." Br J Pharmacol 130(5): 947-62.
- Mantovani, A., F. Bussolino, et al. (1992). "Cytokine regulation of endothelial cell function." Faseb J 6(8): 2591-9.
- Marcus, A. J., M. J. Broekman, et al. (1997). "The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39." J Clin Invest 99(6): 1351-60.
- Marcus, A. J., L. B. Safier, et al. (1991). "Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase. Thromboregulation by endothelial cells." J Clin Invest 88(5): 1690-6.
- Marcus, D. C. and M. A. Scofield (2001). "Apical P2Y4 purinergic receptor controls K⁺ secretion by vestibular dark cell epithelium." Am J Physiol Cell Physiol 281(1): C282-9.
- Marelli-Berg, F. M., E. Peek, et al. (2000). "Isolation of endothelial cells from murine tissue." J Immunol Methods 244(1-2): 205-15.
- Markowitz, D., S. Goff, et al. (1988). "A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids." J Virol 62(4): 1120-4.
- Matsumura, T., M. Takesue, et al. (2004). "Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT." Transplantation 77(9): 1357-65.

- Mauro, M., A. Zlatopolskiy, et al. (2004). "Thienopyridine-linked thrombotic microangiopathy: association with endothelial cell apoptosis and activation of MAP kinase signalling cascades." Br J Haematol 124(2): 200-10.
- McAuslan, B. R., W. G. Reilly, et al. (1983). "Angiogenic factors and their assay: activity of formyl methionyl leucyl phenylalanine, adenosine diphosphate, heparin, copper, and bovine endothelium stimulating factor." Microvasc Res 26(3): 323-38.
- McCloskey, M. A., Y. Fan, et al. (1999). "Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides." J Immunol 163(2): 970-7.
- McEver, R. P. (2001). "Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation." Thromb Haemost 86(3): 746-56.
- McEver, R. P., K. L. Moore, et al. (1995). "Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions." J Biol Chem 270(19): 11025-8.
- Meyers, K. M., H. Holmsen, et al. (1982). "Comparative study of platelet dense granule constituents." Am J Physiol 243(3): R454-61.
- Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." J Cell Physiol 196(3): 430-43.
- Milhoan, K. A., T. A. Lane, et al. (1992). "Hypoxia induces endothelial cells to increase their adherence for neutrophils: role of PAF." Am J Physiol 263(3 Pt 2): H956-62.
- Moccia, F., S. Baruffi, et al. (2001). "P2y1 and P2y2 receptor-operated Ca²⁺ signals in primary cultures of cardiac microvascular endothelial cells." Microvasc Res 61(3): 240-52.
- Moreno, P. R., K. R. Purushothaman, et al. (2006). "Neovascularization in human atherosclerosis." Circulation 113(18): 2245-52.
- Moser, T. L., M. S. Stack, et al. (1999). "Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A 96(6): 2811-6.
- Motte, S., S. Piroton, et al. (1993). "Heterogeneity of ATP receptors in aortic endothelial cells. Involvement of P2y and P2u receptors in inositol phosphate response." Circ Res 72(3): 504-10.
- Murray, J. C. (2001). Angiogenesis Protocols, Humana Press.
- Mustard, J. F., D. W. Perry, et al. (1975). "Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets." Am J Physiol 228(6): 1757-65.
- Muthukkaruppan, V. and R. Auerbach (1979). "Angiogenesis in the mouse cornea." Science 205(4413): 1416-8.
- Nagata, D., M. Mogi, et al. (2003). "AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress." J Biol Chem 278(33): 31000-6.
- Needham, L., N. J. Cusack, et al. (1987). "Characteristics of the P2 purinoceptor that mediates prostacyclin production by pig aortic endothelial cells." Eur J Pharmacol 134(2): 199-209.
- Nelson, A. R., B. Fingleton, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications." J Clin Oncol 18(5): 1135-49.
- Nemerson, Y. (1995). "Tissue factor: then and now." Thromb Haemost 74(1): 180-4.
- Newman, P. J. (1997). "The biology of PECAM-1." J Clin Invest 100(11 Suppl): S25-9.
- Newman, P. J. and D. K. Newman (2003). "Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(6): 953-64.
- Nguyen, M., Y. Shing, et al. (1994). "Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane." Microvasc Res 47(1): 31-40.

- Nguyen, T., L. Erb, et al. (1995). "Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene." J Biol Chem 270(52): 30845-8.
- Nicholas, R. A., W. C. Watt, et al. (1996). "Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor." Mol Pharmacol 50(2): 224-9.
- North, R. A. and E. A. Barnard (1997). "Nucleotide receptors." Curr Opin Neurobiol 7(3): 346-57.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, et al. (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." Cell 79(2): 315-28.
- O'Reilly, M. S., S. Pirie-Shepherd, et al. (1999). "Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin." Science 285(5435): 1926-8.
- Oryu, M., H. Sakamoto, et al. (1996). "Effects of released products from platelets on neutrophilic adhesion to endothelial cells and nylon fibers." J Leukoc Biol 60(1): 77-80.
- Oury, C., E. Toth-Zsomboki, et al. (2002). "P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen." Blood 100(7): 2499-505.
- Packham, M. A., N. L. Bryant, et al. (1989). "Effect of the concentration of Ca²⁺ in the suspending medium on the responses of human and rabbit platelets to aggregating agents." Thromb Haemost 62(3): 968-76.
- Packham, M. A., R. L. Kinlough-Rathbone, et al. (1987). "Thromboxane A₂ causes feedback amplification involving extensive thromboxane A₂ formation on close contact of human platelets in media with a low concentration of ionized calcium." Blood 70(3): 647-51.
- Palmer, D. S., M. T. Aye, et al. (1994). "Adenosine nucleotides and serotonin stimulate von Willebrand factor release from cultured human endothelial cells." Thromb Haemost 72(1): 132-9.
- Park, H. S. and S. M. Hourani (1999). "Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelets." Br J Pharmacol 127(6): 1359-66.
- Passaniti, A., R. M. Taylor, et al. (1992). "A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor." Lab Invest 67(4): 519-28.
- Patel, V., C. Brown, et al. (1996). "Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production." Biochem J 320 (Pt 1): 221-6.
- Paul, A., L. J. Torrie, et al. (2000). "P2Y receptor-mediated inhibition of tumor necrosis factor alpha -stimulated stress-activated protein kinase activity in EAhy926 endothelial cells." J Biol Chem 275(18): 13243-9.
- Pearson, J. D., L. L. Slakey, et al. (1983). "Stimulation of prostaglandin production through purinoceptors on cultured porcine endothelial cells." Biochem J 214(1): 273-6.
- Pece-Barbara, N., S. Vera, et al. (2005). "Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway." J Biol Chem 280(30): 27800-8.
- Pepper, M. S. (2000). "Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire: de la biologie cellulaire à la clinique." Médecine/Sciences 16: 1378-86.

- Pillois, X., H. Chaulet, et al. (2002). "Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration." Circ Res 90(6): 678-81.
- Pinedo, H. M., H. M. Verheul, et al. (1998). "Involvement of platelets in tumour angiogenesis?" Lancet 352(9142): 1775-7.
- Pirotton, S., D. Communi, et al. (1996). "Endothelial P2-purinoceptors: subtypes and signal transduction." J Auton Pharmacol 16(6): 353-6.
- Plunkett, M. L. and J. A. Hailey (1990). "An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate." Lab Invest 62(4): 510-7.
- Polverini, P. J. (1997). "Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases." Exs 79: 11-28.
- Presta, M., M. Rusnati, et al. (1999). "Purine analogue 6-methylmercaptapurine riboside inhibits early and late phases of the angiogenesis process." Cancer Res 59(10): 2417-24.
- Purkiss, J. R., G. F. Wilkinson, et al. (1994). "Differential regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate by co-existing P2Y-purinoceptors and nucleotide receptors on bovine aortic endothelial cells." Br J Pharmacol 111(3): 723-8.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1996). "Relative contribution of P2U- and P2Y-purinoceptors to endothelium-dependent vasodilatation in the golden hamster isolated mesenteric arterial bed." Br J Pharmacol 117(8): 1797-802.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev 50(3): 413-92.
- Ramirez, A. N. and D. L. Kunze (2002). "P2X purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium." Am J Physiol Heart Circ Physiol 282(6): H2106-16.
- Rana, B., D. Mischoulon, et al. (1994). "Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors." Mol Cell Biol 14(9): 5858-69.
- Rand, M. L., D. W. Perry, et al. (1996). "Conditions influencing release of granule contents from human platelets in citrated plasma induced by ADP or the thrombin receptor activating peptide SFLLRN: direct measurement of percent release of beta-thromboglobulin and assessment by flow cytometry of P-selectin expression." Am J Hematol 52(4): 288-94.
- Rathbone, M. P., P. J. Middlemiss, et al. (1992). "Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types." In Vitro Cell Dev Biol 28A(7-8): 529-36.
- Ray, F. R., W. Huang, et al. (2002). "Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts." Atherosclerosis 162(1): 55-61.
- Reimers, H. J. (1985). Adenine nucleotides in blood platelets. The Platelets: Physiology and Pharmacology. Orlando, Academic Press: 85-98.
- Reiss, Y. and B. Engelhardt (1999). "T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2." Int Immunol 11(9): 1527-39.
- Rendu, F. and B. Brohard-Bohn (2001). "The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions." Platelets 12(5): 261-73.
- Ribatti, D., A. Vacca, et al. (1996). "The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis." Int J Dev Biol 40(6): 1189-97.
- Ribes, J. A., C. W. Francis, et al. (1987). "Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells." J Clin Invest 79(1): 117-23.

- Robaye, B., E. Ghanem, et al. (2003). "Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y4-null mice." Mol Pharmacol 63(4): 777-83.
- Robson, S. C., E. Kaczmarek, et al. (1997). "Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation." J Exp Med 185(1): 153-63.
- Robson, S. C., Y. Wu, et al. (2005). "Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation." Semin Thromb Hemost 31(2): 217-33.
- Roux, F. and P. O. Couraud (2005). "Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions." Cell Mol Neurobiol 25(1): 41-58.
- Salmi, M. and S. Jalkanen (2005). "Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking." Nat Rev Immunol 5(10): 760-71.
- Satterwhite, C. M., A. M. Farrelly, et al. (1999). "Chemotactic, mitogenic, and angiogenic actions of UTP on vascular endothelial cells." Am J Physiol 276(3 Pt 2): H1091-7.
- Savi, P., P. Beauverger, et al. (1998). "Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation." FEBS Lett 422(3): 291-5.
- Savi, P. and J. M. Herbert (2005). "Clopidogrel and Ticlopidine: P2Y12 Adenosine Diphosphate-Receptor Antagonists for the Prevention of Atherothrombosis." Semin Thromb Hemost 31(2): 174-83.
- Schelling, M. E., C. J. Meininger, et al. (1988). "Venular endothelial cells from bovine heart." Am J Physiol 254(6 Pt 2): H1211-7.
- Sevigny, J., F. P. Levesque, et al. (1997). "Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques." Biochim Biophys Acta 1334(1): 73-88.
- Sevigny, J., C. Sundberg, et al. (2002). "Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation." Blood 99(8): 2801-9.
- Seye, C. I., N. Yu, et al. (2004). "The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1)." J Biol Chem 279(34): 35679-86.
- Seye, C. I., N. Yu, et al. (2003). "The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells." J Biol Chem 278(27): 24960-5.
- Silverton, R. E. and M. J. Anderson (1961). "Handbook of medical laboratory formulae. London. Butterworths."
- Simon, J., A. K. Filippov, et al. (2002). "Characterization and channel coupling of the P2Y(12) nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells." J Biol Chem 277(35): 31390-400.
- Simon, J., P. Vigne, et al. (2001). "Activity of adenosine diphosphates and triphosphates on a P2Y(T) -type receptor in brain capillary endothelial cells." Br J Pharmacol 132(1): 173-82.
- Simonson, M. S. and M. J. Dunn (1990). "Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family." Faseb J 4(12): 2989-3000.
- Stacey, M., H. H. Lin, et al. (2001). "Human epidermal growth factor (EGF) module-containing mucin-like hormone receptor 3 is a new member of the EGF-TM7 family that recognizes a ligand on human macrophages and activated neutrophils." J Biol Chem 276(22): 18863-70.

- Stam, N. J., J. Klomp, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a novel orphan receptor (P2P) expressed in human pancreas that shows high structural homology to the P2U purinoceptor." FEBS Lett 384(3): 260-4.
- Staton, C. A. and C. E. Lewis (2005). "Angiogenesis inhibitors found within the haemostasis pathway." J Cell Mol Med 9(2): 286-302.
- Stern, D., P. Nawroth, et al. (1985). "An endothelial cell-dependent pathway of coagulation." Proc Natl Acad Sci U S A 82(8): 2523-7.
- Stevens, T., R. Rosenberg, et al. (2001). "NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases." Am J Physiol Cell Physiol 281(5): C1422-33.
- Suarez-Huerta, N., V. Pouillon, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of the mouse P2Y4 nucleotide receptor." Eur J Pharmacol 416(3): 197-202.
- Sunderkotter, C., K. Steinbrink, et al. (1994). "Macrophages and angiogenesis." J Leukoc Biol 55(3): 410-22.
- Swanson, K. D., C. Reigh, et al. (1998). "ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines." J Biol Chem 273(32): 19965-71.
- Sylte, M. J., C. J. Kuckleburg, et al. (2005). "Stimulation of P2X receptors enhances lipooligosaccharide-mediated apoptosis of endothelial cells." J Leukoc Biol 77(6): 958-65.
- Tanaka, N., K. Kawasaki, et al. (2003). "P2Y-receptor regulates size of endothelial cells in an intracellular Ca²⁺ dependent manner." Life Sci 72(13): 1445-53.
- Tanaka, N., K. Kawasaki, et al. (2004). "P2Y receptor-mediated Ca²⁺ signaling increases human vascular endothelial cell permeability." J Pharmacol Sci 95(2): 174-80.
- Terol, M. J., M. C. Cid, et al. (1996). "Expression of intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3/CD50) in malignant lymphoproliferative disorders and solid tumors." Tissue Antigens 48(4 Pt 1): 271-7.
- Teuscher, E. and V. Weidlich (1985). "Adenosine nucleotides, adenosine and adenine as angiogenesis factors." Biomed Biochim Acta 44(3): 493-5.
- TIMAD (1990). "Ticlopidine treatment reduces the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. The TIMAD Study Group." Arch Ophthalmol 108(11): 1577-83.
- Tolnai, S. (1975). "A method for viable cell count." Methods in Cell Science 1: 37-38.
- Trikha, M. and M. T. Nakada (2002). "Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy." Semin Thromb Hemost 28(1): 39-44.
- Vale, P. R., J. M. Isner, et al. (2001). "Therapeutic angiogenesis in critical limb and myocardial ischemia." J Interv Cardiol 14(5): 511-28.
- Van Daele, P., A. Van Coevorden, et al. (1992). "Effects of adenine nucleotides on the proliferation of aortic endothelial cells." Circ Res 70(1): 82-90.
- van den Eijnden-Schrauwen, Y., T. Kooistra, et al. (1995). "Studies on the acute release of tissue-type plasminogen activator from human endothelial cells in vitro and in rats in vivo: evidence for a dynamic storage pool." Blood 85(12): 3510-7.
- Van Der Giet, M., G. Giebing, et al. (2002). "The Role of P2Y Receptors in the Control of Blood Pressure." Drug News Perspect 15(10): 640-646.
- van Mourik, J. A., T. Romani de Wit, et al. (2002). "Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies." Histochem Cell Biol 117(2): 113-22.
- van Son, W. J., F. Wit, et al. (1997). "Decreased expression of glomerular ecto-ATPase in kidney grafts with delayed graft function." Transplant Proc 29(1-2): 352-4.

- Veikkola, T., M. Karkkainen, et al. (2000). "Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors." Cancer Res 60(2): 203-12.
- Vergheze, M. W., T. B. Kneisler, et al. (1996). "P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells." J Biol Chem 271(26): 15597-601.
- Vial, C. and R. J. Evans (2002). "P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries." Mol Pharmacol 62(6): 1438-45.
- Vischer, U. M., L. Jornot, et al. (1995). "Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells." Blood 85(11): 3164-72.
- Vischer, U. M. and C. B. Wollheim (1998). "Purine nucleotides induce regulated secretion of von Willebrand factor: involvement of cytosolic Ca²⁺ and cyclic adenosine monophosphate-dependent signaling in endothelial exocytosis." Blood 91(1): 118-27.
- von Albertini, M., A. Palmethofer, et al. (1998). "Extracellular ATP and ADP activate transcription factor NF-kappa B and induce endothelial cell apoptosis." Biochem Biophys Res Commun 248(3): 822-9.
- von Albertini, M. A., D. M. Stroka, et al. (1997). "Adenosine nucleotides induce E-selectin expression in porcine endothelial cells." Transplant Proc 29(1-2): 1062.
- von Kugelgen, I. (2006). "Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes." Pharmacol Ther 110(3): 415-32.
- von Kugelgen, I. and A. Wetter (2000). "Molecular pharmacology of P2Y-receptors." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 362(4-5): 310-23.
- Wagner, D. D. and R. Bonfanti (1991). "von Willebrand factor and the endothelium." Mayo Clin Proc 66(6): 621-7.
- Wang, D. J., N. N. Huang, et al. (1992). "Extracellular ATP and ADP stimulate proliferation of porcine aortic smooth muscle cells." J Cell Physiol 153(2): 221-33.
- Wang, L., L. Karlsson, et al. (2002). "P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol 40(6): 841-53.
- Warny, M., S. Aboudola, et al. (2001). "P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide." J Biol Chem 276(28): 26051-6.
- Webb, T. E., J. Simon, et al. (1993). "Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor." FEBS Lett 324(2): 219-25.
- Weber, C., L. Fraemohs, et al. (2007). "The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation." Nat Rev Immunol 7(6): 467-77.
- White, P., S. A. Liebhaber, et al. (2002). "129X1/SvJ mouse strain has a novel defect in inflammatory cell recruitment." J Immunol 168(2): 869-74.
- White, P. J., T. E. Webb, et al. (2003). "Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y11 receptors: evidence for agonist-specific signaling." Mol Pharmacol 63(6): 1356-63.
- Wihlborg, A. K., M. Malmsjo, et al. (2003). "Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor." Br J Pharmacol 138(8): 1451-8.
- Wihlborg, A. K., L. Wang, et al. (2004). "ADP receptor P2Y12 is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(10): 1810-5.
- Wilasrusmee, C., M. Da Silva, et al. (2002). "A new in vitro model to study endothelial injury." J Surg Res 104(2): 131-6.

- Wilkinson, G. F., K. McKechnie, et al. (1994). "P2Y purinoceptor and nucleotide receptor-induced relaxation of precontracted bovine aortic collateral artery rings: differential sensitivity to suramin and indomethacin." J Pharmacol Exp Ther 268(2): 881-7.
- Wilkinson, G. F., J. R. Purkiss, et al. (1993). "The regulation of aortic endothelial cells by purines and pyrimidines involves co-existing P2y-purinoceptors and nucleotide receptors linked to phospholipase C." Br J Pharmacol 108(3): 689-93.
- Williams, R. L., S. A. Courtneidge, et al. (1988). "Embryonic lethalties and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene." Cell 52(1): 121-31.
- Yamamoto, K., R. Korenaga, et al. (2000). "Fluid shear stress activates Ca(2+) influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors." Circ Res 87(5): 385-91.
- Yang, S., D. J. Cheek, et al. (1994). "Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells." Circ Res 74(3): 401-7.
- Zhang, H., B. K. Weir, et al. (1997). "P2 purinoceptors in cultured bovine middle cerebral artery endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol 30(6): 767-74.
- Zimmermann, H. (1999). "Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis." Nat Med 5(9): 987-8.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 362(4-5): 299-309.
- Zunkler, B. J., M. Grafe, et al. (1999). "Effects of P2 purinoceptor agonists on membrane potential and intracellular Ca2+ of human cardiac endothelial cells." Pharmacol Toxicol 85(1): 7-15.

Index des figures et tableaux

Figures :

	Page
<u>Figure 1</u> : Structure secondaire des récepteurs P2X	13
<u>Figure 2</u> : Structure des récepteurs P2Y couplés à une protéine $G\alpha_q$	15
<u>Figure 3</u> : Structure des récepteurs P2Y couplés à une protéine $G\alpha_i$	15
<u>Figure 4</u> : Structure et rôle de l'ectoenzyme CD39 dans l'hémostase	28
<u>Figure 5</u> : Schéma des différentes étapes menant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en réponse à une tumeur par exemple.....	31
<u>Figure 6</u> : Le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet	36
<u>Figure 7</u> : Le modèle d'angiogenèse de la cornée	36
<u>Figure 8</u> : Le modèle avec chambre	37
<u>Figure 9</u> : Schéma représentatif de la cascade de la coagulation	44
<u>Figure 10</u> : Schéma représentatif de la structure des molécules de la famille des sélectines	47
<u>Figure 11</u> : Schéma représentatif de la structure des molécules de la superfamille des immunoglobulines	48
<u>Figure 12</u> : Schéma des différentes étapes gouvernant l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales et leur transmigration.....	51
<u>Figure 13</u> : Schéma des molécules adhésives endothéliales permettant l'arrêt, l'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium	53
<u>Figure 14</u> : Photographie de cellules endothéliales de veines de cordon ombilical humain en culture (HUVEC)	56
<u>Figure 15</u> : Aspect du Matrigel après injection chez la souris et quantification de la cellularité	66
<u>Figure 16</u> : Cinétique de la réponse angiogénique dans le Matrigel chez la souris normale	67
<u>Figure 17</u> : Immunomarquage des cellules contenues dans le Matrigel après 7 jours chez la souris normale	70
<u>Figure 18</u> : Effet de l'angiostatine sur la réponse angiogénique après 7 jours chez la souris normale	71
<u>Figure 19</u> : Effet de l'inactivation du gène codant pour le récepteur P2Y ₁	74
<u>Figure 20</u> : Effet de l'inactivation du gène codant pour le récepteur P2Y ₁ dans le modèle de Matrigel supplémenté de FGF-2 250 ng/mL, après 7 jours	75
<u>Figure 21</u> : Effet du traitement au clopidogrel sur la réponse angiogénique après 7 jours.....	78
<u>Figure 22</u> : Structures chimiques des thiénoypyridines	79
<u>Figure 23</u> : Effet du SR25989 sur la réponse angiogénique après 7 jours	80

<u>Figure 24</u> : Quantification de la cellularité des Matrigels des souris témoins et KO P2Y ₄ après 14 jours	84
<u>Figure 25</u> : Colorations en hématoxyline-éosine des Matrigels provenant de souris KO P2Y ₄ après 14 jours	85
<u>Figure 26</u> : Immunomarquage des macrophages présents dans les Matrigels de souris témoins et KO P2Y ₄ après 14 jours	86
<u>Figure 27</u> : Immunomarquage des cellules endothéliales présentes dans les Matrigels de souris témoins et KO P2Y ₄ après 14 jours	87
<u>Figure 28</u> : Profil d'expression des ARNm codants pour les récepteurs P2Y dans les macrophages péritonéaux de souris	91
<u>Figure 29</u> : Tracés des variations intracellulaires de la concentration de Ca ²⁺ dans les macrophages péritonéaux de souris après stimulation par différents agonistes	92
<u>Figure 30</u> : Structure du vecteur rétroviral N-TKmT	96
<u>Figure 31</u> : Schéma récapitulatif de la formation des particules rétrovirales et de l'immortalisation des cellules endothéliales de souris	98
<u>Figure 32</u> : Schéma récapitulatif des principales étapes du protocole d'immortalisation de cellules endothéliales de souris en culture par un rétrovirus	105
<u>Figure 33</u> : Caractérisation des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y ₁	106
<u>Figure 34</u> : Immunomarquage du fvW sur des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y ₁ en culture	107
<u>Figure 35</u> : Immunomarquage de la molécule PECAM-1 sur des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y ₁ en culture	108
<u>Figure 36</u> : Tracés des variations intracellulaires de la concentration de Ca ²⁺ dans les cellules endothéliales immortalisées de poumons de souris témoins et de souris KO P2Y ₁ après stimulation par de l'ADP, de l'ATP et de l'UTP	109
<u>Figure 37</u> : Prolifération des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et de souris KO P2Y ₁ en culture pendant 4 jours	112
<u>Figure 38</u> : Analyse par cytométrie de flux de l'expression de la molécule ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y ₁ à l'état basal ou après stimulation au TNF α	116
<u>Figure 39</u> : Analyse par cytométrie de flux de l'expression de la molécule VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y ₁ à l'état basal ou après stimulation au TNF α	117

<u>Figure 40</u> : Analyse par Western blot de l'expression des molécules ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y ₁ à l'état basal ou après stimulation au TNF α	118
<u>Figure 41</u> : Adhésion de monocytes humains U937 sur des cellules endothéliales immortalisées de souris témoins et KO P2Y ₁ à l'état basal ou après au TNF α	119

Tableaux :

<u>Tableau 1</u> : Récapitulatif de la pharmacologie des différents récepteurs P2Y identifiés et leurs distributions tissulaire et cellulaire.....	16
<u>Tableau 2</u> : Facteurs pro-et antiangiogéniques	34